



TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DEL CONTENIDO DE FOSFOLÍPIDOS EN LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS

Fdo. Tania Ferreiro Portas

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
ANALÍTICA, NUTRICIÓN Y
BROMATOLOGÍA**

LUGO
2015



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS

D. José Luis Rodríguez Otero, Profesor titular del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela,

Como director de la Tesis Doctoral titulada *“Estudio del contenido de fosfolípidos en leche y productos lácteos”*

Presentada por Dña. Tania Ferreiro Portas, alumna del Programa de Doctorado de Ciencia e Ingeniería de los Alimentos (R.D. 778/1998)

Autoriza la presentación de la tesis indicada, considerando que reúne los requisitos exigidos en el artículo 34 del reglamento de Estudios de Doctorado, y que como Director de la misma no incurre en las causas de abstención establecidas en la ley 30/1992.

Fdo.: Dr. D. José Luis Rodríguez Otero



RESUMEN

Los fosfolípidos forman parte de membranas biológicas como las de los glóbulos de la grasa de la leche. En los últimos años ha aumentado el interés por estos compuestos debido a sus propiedades tecnológicas y funcionales. En este estudio se ha optimizado la determinación de los principales fosfolípidos presentes en la leche por HPLC con detector de dispersión de luz. Se ha comparado la concentración de fosfolípidos en leche convencional con leche de producción ecológica y con leche rica en ácido linoleico conjugado. También se ha estudiado la evolución del contenido de fosfolípidos a lo largo del proceso de fabricación de queso fresco, i) por UF partiendo de leche mazada y ii) por el método tradicional a partir de leche.

Palabras clave: fosfolípidos, leche ecológica, ácido linoleico conjugado, queso fresco, leche mazada, ultrafiltración.

RESUMO

Os fosfolípidos forman parte de membranas biológicas como as dos glóbulos da graxa do leite. Nos últimos anos aumentou o interese por estes compostos debido ás súas propiedades tecnológicas e funcionais. Neste estudo optimizouse a determinación dos principais fosfolípidos presentes no leite por HPLC con detector de dispersión de luz. Comparouse a concentración de fosfolípidos en leite convencional con leite de produción ecolóxica e con leite rico en ácido linoleico conxugado. Tamén se estudou a evolución do contido de fosfolípidos ao longo do proceso de fabricación do queixo fresco,

i) por UF partindo de leite mazado e ii) polo método tradicional a partir de leite.

Palabras chave: fosfolípidos, leite ecolóxico, ácido linoleico conxugado, queixo fresco, leite mazado, ultrafiltración.

ABSTRACT

Phospholipids are part of biological membranes, such as milk fat globules. In recent years there has been increasing interest in these compounds due to their technological and functional properties. In this study, HPLC coupled to light scattering detector determination has been optimized for the main phospholipids present in milk. It has been compared the concentration of phospholipids in organic milk production, milk rich in conjugated linoleic acid, and conventional milk. It has been study also the evolution of phospholipid content throughout the process of manufacturing fresh cheese i) by UF starting from buttermilk and ii) by the traditional method from milk.

Keywords: phospholipids, organic milk, conjugated linoleic acid, fresh cheese, buttermilk, ultrafiltration.



A mis hijos

A mi marido



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi director de tesis, el profesor D. José Luis Rodríguez Otero el haberme animado a embarcarme en este trabajo. Le agradezco su enorme paciencia y apoyo en todo momento. Sin él, esto no habría sido posible.

A todas las empresas que han colaborado, tanto suministrando muestras, como aportando información:

A Leche de Galicia S.L., especialmente a Delia, Dasilva y Miguel.

A la Cooperativa Feiraco, en especial a Ismael.

A Innolact S.L., en especial a Sergio y Erika.

A Lácteos Lorán S.L., especialmente a Rosa y Rubén.

A toda la gente que de una manera u otra me han acompañado a lo largo de estos años:

Lucía, sin tu esfuerzo y constancia yo no podría haberlo logrado.

Eva, gracias por esas charlas a media mañana que me hacían el día más fácil y que ahora tanto echo de menos.

A mis padres por hacer lo imposible para que hoy esto sea posible. Os quiero.

A mi marido, Félix, por estar a mi lado y por ayudarme en esos momentos de estrés frente al ordenador.

A mis hijos, Javier y Juan, mi mayor logro. Sois la alegría de mi vida.

A mis amigos y familia, gracias por estar siempre que os he necesitado.



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. LÍPIDOS POLARES	3
1.2. PROPIEDADES TERAPÉUTICAS DE LOS LÍPIDOS POLARES	7
1.2.1. ESFINGOLÍPIDOS	7
1.2.1.1. DIGESTIÓN DE LOS ESFINGOLÍPIDOS	9
1.2.1.2. FUNCIONES DE LOS ESFINGOLÍPIDOS	11
1.2.1.3. ESFINGOLÍPIDOS Y CÁNCER DE COLON	13
1.2.1.4. ESFINGOLÍPIDOS Y REDUCCIÓN DE LOS NIVELES DE COLESTEROL	18
1.2.1.5. ESFINGOLÍPIDOS Y EFECTO BACTERICIDA	25
1.2.2. FOSFOLÍPIDOS	26
1.3. PROPIEDADES TECNOLÓGICAS DE LOS LÍPIDOS POLARES	28
1.4. LÍPIDOS POLARES EN LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS.....	29
1.5. BIBLIOGRAFÍA	33
2. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO: MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y CROMATOGRÁFICO	45
2.1. INTRODUCCIÓN	47
2.2. OBJETIVOS	51
2.3. MATERIAL Y MÉTODOS	52

2.3.1. MUESTRAS	52
2.3.2. ANÁLISIS DE LA GRASA	52
2.3.3. EXTRACCIÓN	53
2.3.3.1. REACTIVOS	53
2.3.3.2. INSTRUMENTACIÓN Y MATERIAL	54
2.3.3.3. MÉTODO DE EXTRACCIÓN	54
2.3.4. CALIBRACIÓN	56
2.3.5. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA	58
2.3.5.1. FASES MÓVILES	58
2.3.5.2. EQUIPO CROMATOGRÁFICO Y MATERIAL	58
2.3.5.3. PROCEDIMIENTO CROMATOGRÁFICO	59
2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
2.4.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO	60
2.4.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO	66
2.4.2.1. LINEALIDAD	66
2.4.2.2. LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN	70
2.4.2.3. PRECISIÓN	72
2.4.2.3.1. Precisión del método cromatográfico.....	73
2.4.2.3.2. Precisión del procedimiento completo	75
2.4.2.4. EXACTITUD	77
2.5. BIBLIOGRAFÍA	78
3. FOSFOLÍPIDOS EN LECHE DE PRODUCCIÓN ECOLÓGICA Y EN LECHE CONVENCIONAL	85
3.1. INTRODUCCIÓN	87

3.2. OBJETIVO	90
3.3. MATERIAL Y MÉTODOS	91
3.3.1. MUESTRAS	91
3.3.2. ANÁLISIS DE LA GRASA	92
3.3.3. DETERMINACIÓN DE FOSFOLÍPIDOS	92
3.3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	92
3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	93
3.5. BIBLIOGRAFÍA	104
4. FOSFOLÍPIDOS EN LECHE RICA EN ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) Y EN LECHE CONVENCIONAL	109
4.1. INTRODUCCIÓN	111
4.2. OBJETIVOS	113
4.3. MATERIAL Y MÉTODOS	113
4.3.1. MUESTRAS	113
4.3.2. ANÁLISIS DE LA GRASA	116
4.3.3. DETERMINACIÓN DE LOS FOSFOLÍPIDOS	116
4.3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	116
4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	116
4.5. BIBLIOGRAFÍA	124
5. EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO DE FOSFOLÍPIDOS EN LA ELABORACIÓN DE QUESO FRESCO POR UF A PARTIR DE LECHE MAZADA	127
5.1. INTRODUCCIÓN	129
5.1.1. LA LECHE MAZADA	129
5.1.2. LA ULTRAFILTRACIÓN	130

5.2. OBJETIVOS	134
5.3. MATERIAL Y MÉTODOS	134
5.3.1. ELABORACIÓN DEL QFLM	134
5.3.2. MUESTRAS	137
5.3.3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS	137
5.3.3.1. ANÁLISIS DE LA GRASA	137
5.3.3.2. ANÁLISIS DE LOS FOSFOLÍPIDOS	139
5.3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	139
5.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	139
5.4.1. LA LECHE MAZADA	139
5.4.2. CONCENTRACIÓN DE LA LECHE MAZADA	153
5.4.3. HOMOGENEIZACIÓN Y PASTERIZACIÓN	156
5.4.4. FERMENTACIÓN Y COAGULACIÓN	157
5.4.5. CONCENTRACIÓN DE LA CUAJADA	158
5.4.6. QUESO FRESCO	159
5.6. BIBLIOGRAFÍA	161
6. EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO DE FOSFOLÍPIDOS EN LA ELABORACIÓN DE QUESO FRESCO POR EL MÉTODO TRADICIONAL	165
6.1. INTRODUCCIÓN	167
6.2. OBJETIVOS	170
6.3. MATERIAL Y MÉTODOS	170
6.3.1. ELABORACIÓN DEL QUESO FRESCO	170
6.3.2. ANÁLISIS DE LA GRASA	172
6.3.3. DETERMINACIÓN DE LOS FOSFOLÍPIDOS	173

6.3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	173
6.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	173
6.5. BIBLIOGRAFÍA	181
7. CONCLUSIONES	185





ÍNDICE DE ABREVIATURAS

µg: microgramo.

µm: micrometro.

µmoles: micromoles.

AOAC: Association of Analytical Communities.

BOE: Boletín Oficial del Estado.

CLA: ácido linoleico conjugado.

CV: coeficiente de variación.

D: Dalton.

DMH: 1,2-Dimetilhidracina.

DOUE: Diario oficial de la Unión Europea.

DS: desviación típica.

ELSD: detector evaporativo de dispersión de luz (Evaporative Light Scattering Detector).

EPA: Environmental Protection Agency.

EURACHEM: European Analytical Chemistry.

FDA: Food and Drug Administration.

FIL-IDF: Federación Internacional de Lechería (International Dairy Federation).

“g”: intensidad del campo gravitatorio terrestre.

GluCer: glucosilceramida.

HDL: lipoproteínas de alta densidad (High Density Lipoprotein).

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography).

ICH: International Conference on Harmonization.

KDa: kilodalton.

LacCer: lactosilceramida.

LDC: límite de cuantificación.

LDD: límite de detección.

LDL: lipoproteínas de baja densidad (Low Density Lipoprotein).

Log: logaritmo.

M: molar.

m/s: metros por segundo.

MS: espectrometría de masas (Mass Spectrometry).

n: número de muestras.

ng: nanogramo.

NMR: resonancia magnética nuclear (Nuclear Magnetic Resonance).

PC: fosfatidilcolina.

PE: fosfatidiletanolamina.

PI: fosfatidilinositol.

PL: fosfolípidos.

PS: fosfatidilserina.

QFLM: queso fresco elaborado a partir de leche mazada.

R^2 : coeficiente de correlación al cuadrado.

S/R: relación señal/ruido.

SM: esfingomielina.

TLC: cromatografía en capa fina (Thin Layer Chromatography).

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa (Tumor Necrosis Factor- α).

UF: ultrafiltración.

USP: United States Pharmacopeia.

UV: ultravioleta.

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

Tabla 1.1. Naturaleza alcohólica de los fosfolípidos.....	4
Tabla 1.2. Clasificación de lípidos polares.....	7
Tabla 1.3. Composición lipídica de la membrana de los glóbulos grasos.....	31
Tabla 1.4. Potenciales efectos beneficiosos de diferentes componentes de la membrana del glóbulo graso.....	33

CAPÍTULO 2: PROCEDIMIENTO ANALÍTICO: MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y CROMATOGRÁFICO

Tabla 2.1. Patrones empleados para la calibración.....	56
Tabla 2.2. Tiempo de retención de los fosfolípidos.....	57
Tabla 2.3. Intervalos de concentración, ecuaciones y coeficientes de correlación al cuadrado de las rectas de calibrado.....	67
Tabla 2.4. Límites de detección y cuantificación.....	72
Tabla 2.5. Repetibilidad y precisión intermedia del método cromatográfico.....	75
Tabla 2.6. Repetibilidad y precisión intermedia del proceso de extracción.....	76
Tabla 2.7. Valores de los ensayos de exactitud.....	78

CAPÍTULO 3: FOSFOLÍPIDOS EN LECHE DE PRODUCCIÓN ECOLÓGICA Y EN LECHE CONVENCIONAL

Tabla 3.1. Contenido de fosfolípidos en mg/kg de leche en muestras de leche ecológica.....	93
Tabla 3.2. Contenido de fosfolípidos en mg/kg de leche en muestras de leche convencional.....	94

Tabla 3.3. Contenido de fosfolípidos en porcentaje sobre materia grasa en muestras de leche ecológica.....	95
--	----

Tabla 3.4. Contenido de fosfolípidos en porcentaje sobre materia grasa en muestras de leche convencional.....	96
---	----

Tabla 3.5. Contenido y perfil de fosfolípidos en leche de vaca en otros estudios.....	100
---	-----

Tabla 3.6. Contenido relativo de fosfolípidos en muestras de leche ecológica.....	102
---	-----

Tabla 3.7. Contenido relativo de fosfolípidos en muestras de leche convencional.....	103
--	-----

CAPÍTULO 4: FOSFOLÍPIDOS EN LECHE RICA EN ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) Y EN LECHE CONVENCIONAL

Tabla 4.1. Componentes para preparar 10 kg de pienso para vacas que producen leche convencional y leche enriquecida en CLA.....	115
---	-----

Tabla 4.2. Contenido de fosfolípidos en mg/kg de leche en muestras de leche rica en CLA.....	117
--	-----

Tabla 4.3. Contenido de fosfolípidos en mg/kg de leche en muestras de leche convencional.....	118
---	-----

Tabla 4.4. Contenido de fosfolípidos en porcentaje sobre materia grasa en muestras de leche rica en CLA.....	119
--	-----

Tabla 4.5. Contenido de fosfolípidos en porcentaje sobre materia grasa en muestras de leche convencional.....	120
---	-----

Tabla 4.6. Contenido relativo de fosfolípidos en muestras de leche rica en CLA.....	123
---	-----

Tabla 4.7. Contenido relativo de fosfolípidos en muestras de leche convencional.....	124
--	-----

5. EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO DE FOSFOLÍPIDOS EN LA ELABORACIÓN DE QUESO FRESCO POR UF A PARTIR DE LECHE MAZADA

Tabla 5.1. Contenido de fosfolípidos en mg/100 g de producto en el ensayo 1.....	140
Tabla 5.2. Contenido de fosfolípidos en mg/100 g de producto en el ensayo 2.....	141
Tabla 5.3. Contenido de fosfolípidos en mg/100 g de producto en el ensayo 3.....	142
Tabla 5.4. Contenido de fosfolípidos en mg/100 g de producto en el ensayo 4.....	143
Tabla 5.5. Contenido de fosfolípidos en mg/100 g de producto en el ensayo 5.....	144
Tabla 5.6. Contenido medio de fosfolípidos en mg/100 g de producto en los cinco ensayos.....	145
Tabla 5.7. Contenido relativo de fosfolípidos en el ensayo 1.....	146
Tabla 5.8. Contenido relativo de fosfolípidos en el ensayo 2.....	147
Tabla 5.9. Contenido relativo de fosfolípidos en el ensayo 3.....	148
Tabla 5.10. Contenido relativo de fosfolípidos en el ensayo 4.....	149
Tabla 5.11. Contenido relativo de fosfolípidos en el ensayo 5.....	150
Tabla 5.12. Contenido relativo medio de fosfolípidos en los cinco ensayos.....	151

6. EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO DE FOSFOLÍPIDOS EN LA ELABORACIÓN DE QUESO FRESCO POR EL MÉTODO TRADICIONAL

Tabla 6.1. Contenido de fosfolípidos en mg/100 g de producto en la fabricación 1..... 174

Tabla 6.2. Contenido de fosfolípidos en mg/100 g de producto en la fabricación 2..... 174

Tabla 6.3. Contenido de fosfolípidos en mg/100 g de producto en la fabricación 3..... 174

Tabla 6.4. Contenido de fosfolípidos en mg/100 g de producto en las tres fabricaciones..... 175

Tabla 6.5. Contenido relativo de fosfolípidos en la fabricación 1..... 175

Tabla 6.6. Contenido relativo de fosfolípidos en la fabricación 2..... 176

Tabla 6.7. Contenido relativo de fosfolípidos en la fabricación 3..... 176

Tabla 6.8. Contenido relativo medio de fosfolípidos en las tres fabricaciones..... 176

Tabla 6.9. Valores recogidos en la bibliografía del contenido de fosfolípidos y su porcentaje relativo en queso fresco y suero..... 179

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

Figura 1.1. Estructura química de un fosfolípido	3
Figura 1.2. Estructura química de la esfingosina	4
Figura 1.3. Estructura química de la ceramida	5
Figura 1.4. Estructura química de la esfingomielina	5
Figura 1.5. Estructura química de la un cerebrósido	6
Figura 1.6. Esquema de la digestión y metabolismo de la esfingomielina en el intestino	10
Figura 1.7. Descripción de la función celular de los esfingolípidos.....	12
Figura 1.8. Modelo de supresión del cáncer de colon	14
Figura 1.9. Emulsión de glóbulos de grasa en leche	29

CAPÍTULO 2: PROCEDIMIENTO ANALÍTICO: MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y CROMATOGRÁFICO

Figura 2.1. Esquema de funcionamiento del ELSD	50
Figura 2.2. Proceso de extracción	56
Figura 2.3. Equipo HPLC-ELSD	59
Figura 2.4. Cromatograma de una disolución multipatrón. Fases móviles: cloroformo:metanol:buffer (1 M ácido fórmico y trietilamina)	62
Figura 2.5. Cromatograma de una disolución multipatrón. Fases móviles: cloroformo: metanol: buffer (0,5% ácido fórmico y amoniaco)	64
Figura 2.6. Recta de calibrado de PE	68
Figura 2.7. Recta de calibrado de PI	68

Figura 2.8. Recta de calibrado de PC	69
Figura 2.9. Recta de calibrado de PS	69
Figura 2.10. Recta de calibrado de SM	70

CAPÍTULO 3: FOSFOLÍPIDOS EN LECHE DE PRODUCCIÓN ECOLÓGICA Y EN LECHE CONVENCIONAL

Figura 3.1. Vacas de producción ecológica	88
Figura 3.2. Vacas lecheras en producción intensiva	89
Figura 3.3. Logotipo de los alimentos de producción ecológica de la Unión Europea.....	90

CAPÍTULO 4: FOSFOLÍPIDOS EN LECHE RICA EN ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) Y EN LECHE CONVENCIONAL

Figura 4.1. Estructura química del ácido ruménico: cis-9,trans-11 octadecadienoico.....	111
---	-----

5. EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO DE FOSFOLÍPIDOS EN LA ELABORACIÓN DE QUESO FRESCO POR UF A PARTIR DE LECHE MAZADA

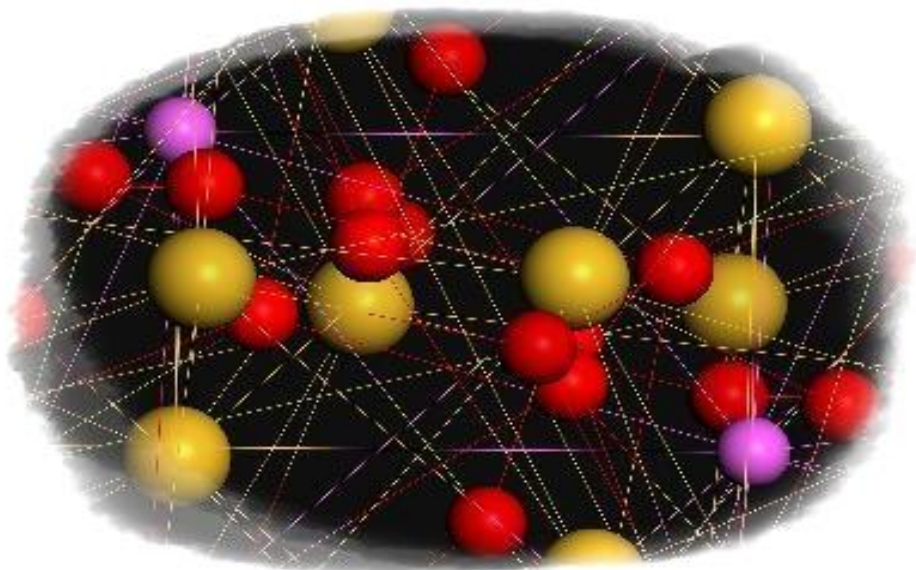
Figura 5.1. Proceso de ultrafiltración por flujo tangencial....	131
Figura 5.2. Equipo de ultrafiltración.....	133
Figura 5.3. Esquema del proceso de elaboración del QFLM.....	136

6. EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO DE FOSFOLÍPIDOS EN LA ELABORACIÓN DE QUESO FRESCO POR EL MÉTODO TRADICIONAL

Figura 6.1. Desuerado de queso fresco en sacos de tela....	171
Figura 6.2. Envasado de queso fresco.....	172







1. INTRODUCCIÓN



1.1. LÍPIDOS POLARES

Los lípidos polares son componentes saponificables de la grasa en cuya estructura molecular, además de carbono, hidrógeno y oxígeno, hay también nitrógeno, fósforo, azufre o un glúcido. Son compuestos minoritarios de los alimentos, pero que sin embargo tienen una importante actividad funcional. Comparten una estructura global común con una parte apolar, constituida por ácidos grasos o ceramida, con largas cadenas hidrocarbonadas y una parte polar, de naturaleza alcohólica. Por su carácter anfipático intervienen, junto con las proteínas, en la formación de membranas, estabilizando sus estructuras (Mataix y Sánchez, 2002).

Se pueden subdividir en fosfolípidos y esfingolípidos:

- **Fosfolípidos:** son estructuras formadas por un diglicérido esterificado con ácido fosfórico, esterificado a su vez con un aminoalcohol o un polialcohol (Figura 1.1.). La naturaleza de este último compuesto alcohólico origina los distintos tipos de fosfoglicéridos (Tabla 1.1.).

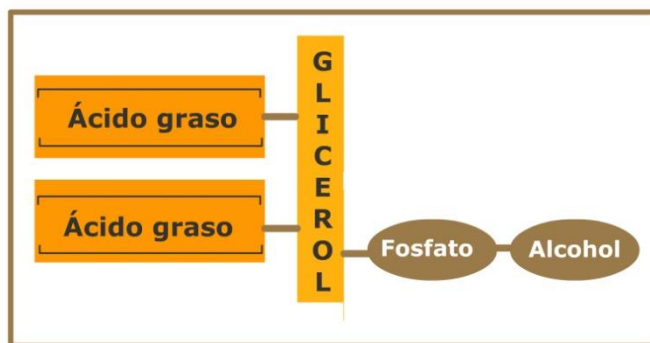
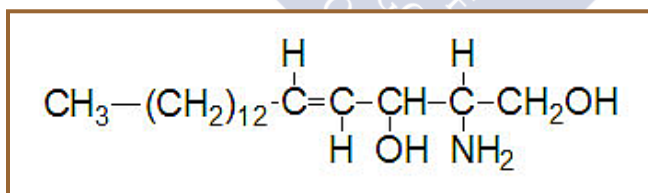


Figura 1. 1. Estructura química de los fosfolípidos.

Tabla 1. 1. Naturaleza alcohólica de los fosfolípidos.

ALCOHOL	NOMBRE
Colina	Fosfatidilcolina
Etanolamina	Fosfatidiletanolamina
Serina	Fosfatidilserina
Inositol	Fosfatidilinositol
Glicerol	Fosfatidilglicerol

- **Esfingolípidos:** la característica de la unidad estructural de los esfingolípidos es la base esfingoide, que consiste en una larga cadena (12-22 átomos de carbono) amino alifática con dos o tres grupos hidroxilo. La esfingosina (Figura 1.2.) es la base esfingoide más prevalente en los mamíferos, contiene 18 átomos de carbono, dos grupos hidroxilo y un doble enlace.

**Figura 1. 2. Estructura química de la esfingosina.**

La **ceramida** se forma cuando el grupo amino de la base esfingoide se une con un ácido graso saturado (Figura 1.3.).

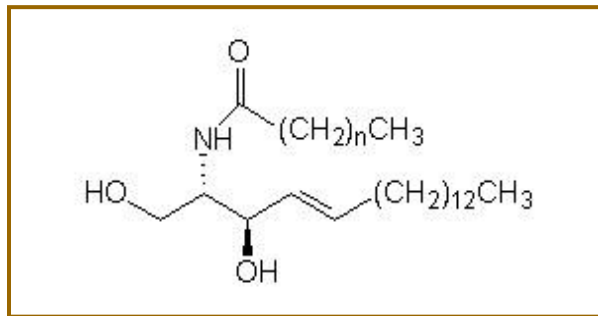


Figura 1. 3. Estructura química de la ceramida.

Los **esfingolípidos** se pueden a su vez subdividir en tres clases:

- Esfingomielinas: añaden a la estructura de la ceramida una molécula de fosfocolina o fosfoetanolamina (Figura 1.4.).



Figura 1. 4. Estructura química de la esfingomielina.

- Cerebrósidos: se les llama frecuentemente glucoesfingolípidos debido a su estructura, que consiste en la unión de una ceramida con una cadena glucídica (Figura 1.5.). Cuando el azúcar es galactosa se obtiene un galactocerebrósido y cuando es glucosa, un glucocerebrósido. Existen también cerebrósidos más complejos denominados globósidos formados por tri- y

tetraglicosilceramidas con un residuo terminal de galactosamina.



Figura 1. 5. Estructura química de los cerebrosideos.

- Gangliósidos: son el grupo más complejo de los esfingolípidos. Son oligosacáridos de ceramida, que presentan uno o más grupos de ácido siálico, además de glucosa, galactosa y galactosamina.

Esta clasificación no es rígida, existiendo otros criterios para la agrupación de esta clase de lípidos relativamente heterogéneos. En la Tabla 1.2. se muestra otra clasificación alternativa, donde el término “**fosfolípidos**” engloba aquellos compuestos que presentan ácido fosfórico en su estructura, diferenciándose dos categorías: los derivados de la glicerina (fosfoglicéridos) y los que no la contienen (fosfoesfingolípidos). El término “**glucolípidos**” se utiliza para referirse a aquellos lípidos polares que contienen azúcares en su estructura.

Tabla 1. 2. Clasificación de los lípidos polares.

Lípidos polares	Fosfolípidos	Fosfoglicéridos	Fosfatidilserina Fosfatidilcolina (lecitina) Fosfatidiletanolamina (cefalina) Fosfatidilinositol Fosfatidilglicerol
		Fosfoesfingolípidos	Esfingomiolina
	Glucolípidos	Cerebrósidos, Gangliósidos	

1.2. PROPIEDADES TERAPÉUTICAS DE LOS LÍPIDOS POLARES

Los lípidos polares han suscitado un gran interés por sus múltiples beneficios para la salud, atribuyéndoseles propiedades anticancerígenas, bacteriostáticas, efecto hipocolesterolémico y capacidad de mejorar la función cerebral (Rombaut y col., 2005). De estas moléculas, que son extremadamente versátiles, se esperan nuevos avances acerca de su importancia en la salud.

1.2.1. ESFINGOLÍPIDOS

Están presentes en todas las células eucariotas y en algunos organismos procariotas, de ahí que se encuentren en la mayoría de los alimentos aunque en pequeñas cantidades, que van desde pocos $\mu\text{moles/kg}$ en frutas y algunas verduras hasta varios milimoles/kg en productos lácteos, huevos y soja. Su ingesta diaria ha sido estimada en 0,3-0,4 g/día, que aproximadamente supone el 0,01-0,02% (m/m) de la dieta, aunque dicha ingesta puede variar considerablemente en

individuos que consumen alimentos ricos en estos compuestos, como son los productos lácteos (Vesper y col., 1999).

Los esfingolípidos no parecen ser compuestos esenciales de la dieta y no hay evidencia de que estos compuestos sean necesarios para el crecimiento y desarrollo bajo condiciones normales, porque todas las células son capaces de sintetizar *de novo* esfingolípidos (Merrill y col., 1985; Nagiec y col., 1996). Sin embargo, la aportación de esfingolípidos exógenos es necesaria para el crecimiento celular cuando existe un déficit de serina-palmitoil transferasa, la enzima inicial de la biosíntesis de esfingolípidos. Esto quiere decir, que sí son necesarios para el normal funcionamiento celular (Hanada y col., 1992).

Ratones alimentados con una dieta sin esfingolípidos no mostraron restricciones en el crecimiento o cambios en la química sanguínea (Schmelz y col., 1996). Por otra parte, una alimentación a corto y largo plazo con grandes cantidades de esfingomielina (SM) y cerebrósidos (1% de la dieta) no mostró efectos deletéreos en ratas (Imaizumi y col., 1992; Kobayashi y col., 1997). Estos estudios indican que los esfingolípidos de la dieta no son esenciales, pero tampoco tienen efectos perjudiciales incluso en altas concentraciones, un importante prerrequisito para estudios de intervención dietética.

Tanto los esfingolípidos como los productos originados en su digestión (ceramidas y esfingosinas), son compuestos altamente bioactivos que ejercen efectos importantes en la regulación celular (Vesper y col., 1999).

1.2.1.1. DIGESTIÓN DE LOS ESFINGOLÍPIDOS

▪ Hidrólisis en el tracto gastrointestinal

En modelos animales, la SM y los cerebrósidos sufren una pequeña escisión en el estómago y son posteriormente hidrolizados en el intestino delgado y colon de roedores, donde están presentes las enzimas de la digestión de los esfingolípidos (esfingomielinasas, glucosilceramidases y ceramidases) (Nilsson, 1968; Schmelz y col., 1994).

La digestión de los esfingolípidos complejos es incompleta y alrededor de un 25% de la dosis administrada a ratas es excretada por las heces, donde un 10% son moléculas intactas, un 80-90% ceramida y un 3-6% esfingosina libre (Nilsson, 1968). Nyberg y col. (1997) encontraron una correlación directa entre la cantidad de SM suministrada y la cantidad presente en el colon.

Los compuestos que no se digieren y absorben en el intestino delgado se transportan al colon, donde sufren una hidrólisis parcial o total, probablemente por la acción de la microflora presente, ya que animales sin microflora mostraron una drástica reducción de la hidrólisis (Duan y col., 1996).

Estudios similares con cerebrósidos muestran que el 43% se excreta, un 40-70% en forma de moléculas intactas y un 25-60% en forma de ceramida (Nilsson, 1968).

La principal limitación del uso de ratones como modelos animales es el corto tiempo de tránsito intestinal, que puede no ser suficiente para la digestión de los esfingolípidos (Schmelz, 2000).

- **Absorción**

Los metabolitos generados tras la hidrólisis enzimática de los esfingolípidos complejos son absorbidos rápidamente y utilizados para sintetizarlos de nuevo o bien son degradados a ácidos grasos (Schmelz y col., 1994). En la Figura 1.6. se esquematiza la digestión y metabolismo de la SM en el intestino. La SM se hidroliza a ceramida y esfingosina en el lumen y estos metabolitos se usan para resintetizar esfingolípidos más complejos (cerebrósidos y gangliósidos). Parte de la esfingosina se degrada vía esfingosina 1-fosfato a hexadecenal (precursor de ácidos grasos) y etanolamina fosfato (Schmelz y col., 1994, Merrill y col., 1995).

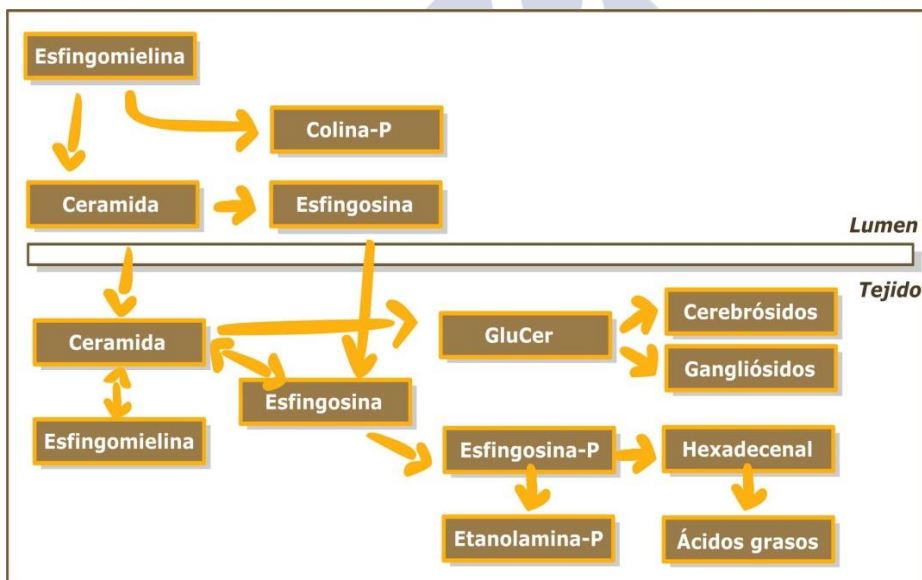


Figura 1. 6. Esquema de la digestión y metabolismo de la esfingomielina en el intestino. (Adaptado de Merrill y col., 1997).

Cuando se administraron esfingolípidos marcados con isótopos radioactivos a ratas, se vio que una pequeña cantidad

de metabolitos se encontraba en la sangre, linfa e hígado, lo que implica que algunos componentes de los esfingolípidos procedentes de la dieta fueron transportados desde la mucosa intestinal al sistema circulatorio. El resto de metabolitos quedaron retenidos en la mucosa del intestino (Schmelz y col., 1994, Merrill y col., 1995).

1.2.1.2. FUNCIONES DE LOS ESFINGOLÍPIDOS

Cada detalle de la estructura de los esfingolípidos está relacionado con una función bioquímica. El grupo glucídico actúa como ligando tanto para las proteínas de la matriz extracelular como para los receptores de factores de crecimiento, además de ser un sitio de unión para determinados microorganismos, toxinas y virus. El esqueleto de ceramida permite formar estructuras únicas en membranas celulares, lipoproteínas y piel. La cadena alquilo es en su mayoría saturada y la región interfacial de la ceramida (los grupos hidroxilo y amino en los carbonos del 1 al 3) facilitan la interacción con las células vecinas mediante enlaces de hidrógeno, de ahí que los esfingolípidos tengan alta temperatura de transición de fase y tiendan a crear microdominios (Vesper y col., 1999; Merrill y col., 2001). Los metabolitos derivados de los esfingolípidos actúan como segundos mensajeros de una creciente lista de agonistas, incluyendo factores de crecimiento (factor de crecimiento derivado de plaquetas), citoquinas (factor de necrosis tumoral α (TNF- α)), quimioterapéuticos (daunorubicina, vincristina) y agentes estresantes como la radiación y (Riboni y col., 1997). Estos agonistas inducen la

hidrólisis de los esfingolípidos complejos, liberándose compuestos altamente bioactivos como ceramida, esfingosina y esfingosina-1-fosfato, entre otros (Schmelz, 2000). Esto es crucial en la respuesta celular, puesto que la ceramida y esfingosina son inhibidores del crecimiento, y/o inducen la muerte celular (Hannun, 1994), mientras que la esfingosina-1-fosfato inhibe la apoptosis y es un potente agente mitogénico (Olivera y Spiegel, 1993) (Figura 1.7.).

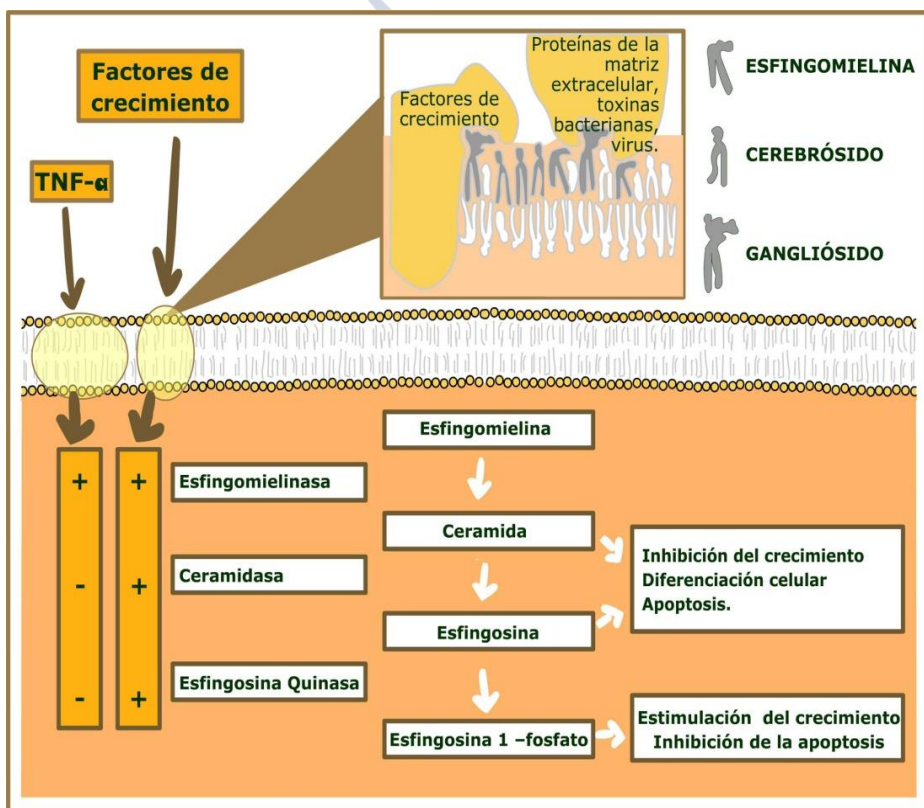


Figura 1. 7. Descripción de la función celular de los esfingolípidos. (Adaptado de Vesper y col., 1999).

1.2.1.3. ESFINGOLÍPIDOS Y CÁNCER DE COLON

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por una división y crecimiento descontrolado de las células del organismo. Las células viven en un proceso continuo de división, reproducción, muerte y sustitución. Normalmente, esto sucede de forma muy ordenada, pero en ocasiones una sola célula experimenta un cambio y empieza un proceso de crecimiento incontrolado, que lleva a la producción de otras células anormales, que poseen la capacidad de invadir el órgano donde se originaron e, incluso, colonizar órganos más alejados (proceso de metástasis).

Los esfingolípidos regulan procesos importantes en la carcinogénesis (crecimiento, diferenciación y muerte celular), de ahí la posible consideración de estos compuestos como agentes quimioterapéuticos y/o quimiopreventivos en los procesos tumorales.

En la Figura 1.8. se muestra un modelo de supresión del cáncer de colon (Vesper y col., 1999). La absorción de bases esfingoides y, probablemente, ceramida derivadas de la digestión de los esfingolípidos procedentes de la dieta pueden inhibir el crecimiento celular e inducir apoptosis en células tumorales, quizás en respuesta a la deficiencia de la enzima esfingomielinasa detectada en la neoplasia colónica que fue descrita por Dudeja y col. (1986).

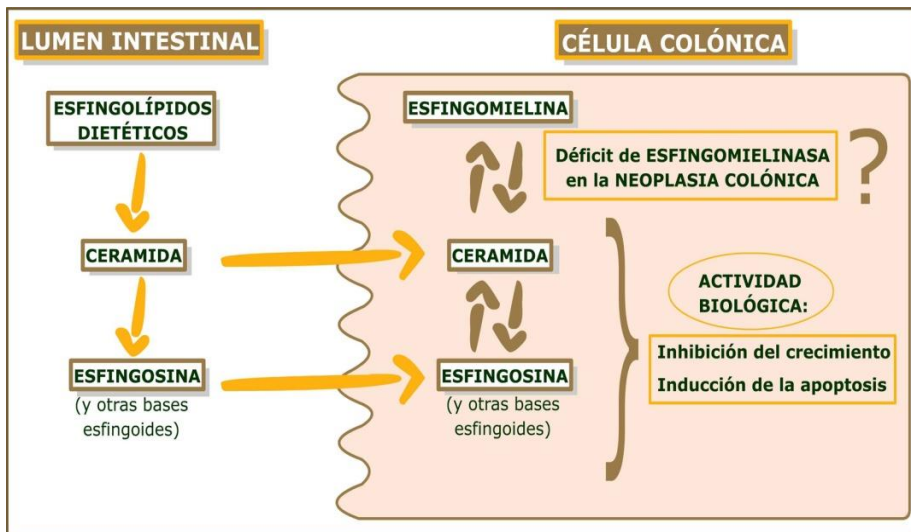


Figura 1. 8. Modelo de supresión del cáncer de colon.
(Adaptado de Vesper y col., 1999).

La implicación de los esfingolípidos en el tratamiento del cáncer ha sido demostrada en diferentes estudios *in vitro*. La irradiación gamma o agentes quimioterapéuticos (daunorubicina, doxorubicina y tamoxifeno) producen una inducción de la apoptosis vía incremento de la ceramida y/o esfingosina en las células, bien por hidrólisis de esfingolípidos complejos o a través de la síntesis *de novo* (Andrieu-Abadie y Levade, 2002, Pettus y col., 2002). El fracaso en la generación de estos metabolitos parece ser clave en la resistencia de algunas células tumorales a la quimioterapia (Wrigh y col., 1996).

En células HT29 (línea celular de cáncer de colon humano) incubadas con fumonisina (micotoxina producida por *Fusarium moniliforme* y *Fusarium proliferatum*), se produjo la inducción de la apoptosis vía incremento de bases esfingoides endógenas (Schmelz y col., 1998). La inhibición del crecimiento

celular a través de los esfingolípidos también fue observada en otras líneas celulares (Stevens y col., 1990).

En un estudio realizado en animales de experimentación para determinar si los esfingolípidos dietéticos afectan a la respuesta de las células cancerígenas del colon que fue llevado a cabo por Dillehay y col. (1994), se suministró SM procedente de leche a ratones CF1 que habían sido tratados con DMH (1,2-Dimetilhidracina) para inducir el cáncer de colon. La suplementación duró 28 semanas, al cabo de las cuales se vio que aún no se había iniciado el proceso tumoral, por lo que se prosiguió con el estudio alimentando a los ratones con la misma dieta (sin SM) que recibieron los ratones control, durante 24 semanas más. La suplementación de SM (0,025-0,1% de la dieta) no influyó en la ganancia de peso y redujo el número de focos de criptas aberrantes (uno de los primeros cambios morfológicos que aparecen en el desarrollo del cáncer de colon) y la incidencia de tumores. No obstante, la disminución del número de tumores tuvo una significación estadística marginal, quizás porque el aporte de SM se interrumpió antes de la finalización del estudio.

En un estudio posterior (Schmelz y col., 1996), la SM (0,025-0,1% de la dieta) obtenida de leche en polvo desnatada y de leche mazada redujo los focos de criptas aberrantes en un 70% y el número de criptas por foco en un 30% en ratones tratados con DMH. Sin embargo, en estudios a largo plazo (después de 40 semanas) no hubo diferencias en el número de tumores, pero todos los tumores en el grupo control fueron adenocarcinomas malignos, mientras que el 31% de los tumores

del grupo alimentado con esfingolípidos fueron adenomas benignos. Este estudio sugiere que los esfingolípidos procedentes de la dieta bloquean la progresión de adenomas a adenocarcinomas.

Schmelz y col. (1997) usaron SM sintetizada químicamente para confirmar que el efecto inhibidor de la SM de la leche se debe al compuesto *per se* y no a un posible contaminante procedente de la purificación. Además, la gran potencia de la dihidroesfingomielina frente a la SM sintética revela que el doble enlace 4, 5 trans del esqueleto esfingoide no es requerido para la inhibición de los focos de criptas aberrantes y por lo tanto el efecto inhibidor parece ser debido a la base esfingoide libre más que a la ceramida (Vesper y col., 1999).

La eficacia de los glucolípidos de la leche mazada en la supresión del cáncer de colon también fue estudiada (Schmelz y col., 2000). Glucosilceramida (GluCer), lactosilceramida (LacCer) y gangliósido GD3 fueron suministrados individualmente a ratones CF1 tratados con DMH, en concentraciones de 0,025% ó 0,1% de la dieta durante cuatro semanas. Los resultados muestran una inhibición en la formación de focos de criptas aberrantes del 50-60%, comparable con el efecto de la esfingomielina en los estudios anteriores. Por lo tanto, el efecto de los esfingolípidos en el cáncer de colon no se limita a compuestos con un determinado grupo funcional.

También se ha visto que los esfingolípidos eliminan tumores en ratones Min (Merrill y col., 2001). Estos ratones tienen un defecto genético similar al encontrado en la poliposis

adenomatosa familiar y también está presente en casos esporádicos de cáncer de colon en humanos (Powell y col., 1992). El hecho de que los esfingolípidos puedan “corregir” una mutación genética en ratones que tienen un defecto genético similar al encontrado en humanos, sugiere que estos compuestos pueden ejercer un efecto positivo contra el cáncer de colon en seres humanos (Merrill y col., 2001).

Para distinguir entre un efecto quimiopreventivo y quimioterapéutico, se llevó a cabo un estudio por Lemonier y col. (2003), en el cual se suministró SM a ratones antes y después de la iniciación del tumor y, en ambos casos, tuvo lugar una reducción de la formación de tumores, sin diferencias significativas entre los dos grupos. Sin embargo, el efecto de los esfingolípidos en estadios tardíos de la enfermedad, por ejemplo cuando ya se han formado pólipos, aún no es conocido.

Por otra parte, también cabe destacar que la cantidad de esfingolípidos empleados en estos estudios (0,025 - 0,1% de la dieta) es comparable con la cantidad presente en leche, productos lácteos y otros alimentos (Jensen y Newburg, 1995; Vesper y col., 1999). De ahí que, si ratones y humanos tienen un comportamiento similar respecto al cáncer de colon y esfingolípidos, su consumo, bien a través de la dieta o como suplementos, podría reducir el riesgo de esta enfermedad. Sin embargo, ningún estudio clínico ni epidemiológico ha evaluado la influencia de esta clase de lípidos procedentes de la dieta en el cáncer de colon en humanos (Vesper y col., 1999). La aproximación más cercana que se ha llevado a cabo ha sido un estudio clínico piloto (Schwartz y col., 1997), donde se estudió la

toxicidad y eficacia de una molécula sintética denominada “safingol” (L-tri-dihidroesfingosina) en 14 pacientes con diferentes tipos de tumores. Aunque se trata de un enantiómero de la dihidroesfingosina que no está presente en la naturaleza, puede indicar que los esfingolípidos pueden inhibir otros tipos de cáncer, además del de colon. Esta hipótesis fue estudiada en células, donde se vio que las bases esfingoides afectan al proceso de metástasis (Endo y col., 1991, Sadahira y col., 1992) y, por lo tanto, pueden ejercer efectos en tumores localizados en otras zonas del cuerpo.

Por último, mencionar que algunos alimentos ricos en esfingolípidos como los productos lácteos, han sido estudiados por su posible papel anticancerígeno. Según Parodi (1997), puede existir un efecto sinérgico, de tal manera que el efecto de los esfingolípidos puede ser potenciado por componentes anticancerígenos como el calcio.

1.2.1.4. ESFINGOLÍPIDOS Y REDUCCIÓN DE LOS NIVELES DE COLESTEROL

El colesterol es uno de los lípidos que forma parte de nuestro organismo. Es un componente fundamental de las membranas celulares y participa en la síntesis de hormonas y algunas vitaminas, así como en la síntesis de los ácidos biliares que facilitan la digestión y absorción de las grasas de la dieta.

Los procesos de incorporación, síntesis, distribución y eliminación del colesterol están condicionados por una diversidad de factores, tanto hereditarios como nutricionales. El organismo dispone de un complejo sistema de control para que

el nivel global de colesterol se mantenga equilibrado, metabolizando y excretando el exceso. La regulación de la síntesis la hace el propio colesterol. Cuando su nivel es alto, mediante una serie de acciones complejas detiene la síntesis en un ejemplo de retroregulación. Cualquier alteración en el balance puede originar subidas persistentes e indeseables y la aparición, a medio plazo, de graves problemas de salud.

La mayor parte de la absorción de las grasas, incluido el colesterol, tiene lugar en el intestino delgado. Las sales biliares son fundamentales para emulsionar las grandes gotas lipídicas en pequeñas gotas, que posteriormente van a formar las micelas, todavía insolubles en agua, sobre las que actúan las enzimas pancreáticas. Las lipasas, colesterol esterasas y fosfolipasas consiguen la hidrólisis final de los lípidos con el fin de que sean absorbidos. El proceso de absorción se realiza por simple difusión y una vez en el interior de los enterocitos se resintetizan de nuevo las grasas y se unen a proteínas específicas para formar lipoproteínas que son transportadas vía linfática al torrente sanguíneo. Las dos lipoproteínas más conocidas son las lipoproteínas de baja densidad (LDL), conocidas como “colesterol malo”; y las lipoproteínas de alta densidad (HDL), llamadas también “colesterol bueno”. Las LDL se encargan de entregar el colesterol a las células para su utilización; mientras que las HDL son beneficiosas porque permiten la eliminación del exceso de colesterol de las células y arterias.

Si aumenta mucho la concentración de las lipoproteínas pueden superar el límite de solubilidad admitido y empezar a

depositarse en las paredes de los vasos sanguíneos. Estas deposiciones, fundamentalmente de LDL, se denominan ateromas, y la patología que se presenta cuando se generalizan es la aterosclerosis. La hipercolesterolemia conlleva un aumento de la concentración sérica de LDL, el desarrollo de aterosclerosis, lesiones arteriales y en último extremo, problemas cardiocirculatorios (angina de pecho, infarto de miocardio o hemorragia cerebral).

La asociación entre SM y colesterol ha intrigado a los investigadores durante décadas (Vesper y col., 1999). El alto grado de saturación de la cadena acil y el doble enlace 4, 5 trans de la SM facilita la interacción con el colesterol (Noakes y col., 2002) y ambos compuestos forman un tipo de microdominio en las membranas celulares denominado caveola (Pfeuffer y Schrezenmeir, 2001). Estas estructuras son ricas en receptores de membrana y proteínas. Estudios *in vitro* con células Caco-2 muestran que una depleción de SM o colesterol desestabiliza las caveolas y la funcionalidad de las proteínas asociadas (Stevens y Tang, 1997). Además, estos microdominios están implicados en procesos celulares tales como la transducción de señal, ordenación celular, endocitosis y transporte del colesterol (Brown y London, 2000; van Meer y Lisman, 2002).

Diferentes estudios *in vitro* e *in vivo* han vinculado la SM procedente de la dieta con la disminución de los niveles de colesterol. Uno de los mecanismos potenciales que puede explicar dicha vinculación se basa en el hecho de que la SM disminuye la hidrólisis, la solubilización micelar y la transferencia del colesterol desde la matriz micelar al enterocito (Noh y Koo,

2003), reduciéndose la absorción de colesterol por las células intestinales. Además, la hidrólisis lenta e incompleta de la esfingomielina en el duodeno y yeyuno, donde tiene lugar la hidrólisis de las grasas, permite la interacción de la esfingomielina intacta con el colesterol (Noh y Koo, 2003).

Por otra parte, también se ha sugerido que el mecanismo podría actuar no sólo al nivel intestinal de formación de micelas, sino afectando también a la composición de la membrana de las células intestinales. Un estudio (Chen y col., 1992) con células Caco-2 demostró que el contenido en SM en las membranas del borde en cepillo del enterocito juega un papel regulador en la absorción del colesterol micelar. Cuando la SM de la membrana apical de células Caco-2 fue hidrolizada, se produjo un descenso del 50% en la absorción del colesterol procedente de las micelas. Estos autores concluyen que, cuando las membranas contienen menos SM se produce un decrecimiento en la capacidad de aceptar y solubilizar colesterol.

Por lo tanto, el contenido de SM en las micelas intestinales y en las membranas del borde en cepillo del enterocito podría regular la entrada de colesterol en la célula y su empaquetamiento posterior en quilomicrones (lipoproteínas que transportan el colesterol desde el intestino al hígado) (Chen y col., 1992).

En base a estas observaciones, es posible que la alta afinidad de la SM por el colesterol en las micelas y en el lumen intestinal, inhiba la transferencia del colesterol micelar al enterocito, mientras que la SM en la membrana del borde en

cepillo del enterocito incrementa la absorción celular, y de ahí, la secreción de colesterol vía lipoproteínas (Noh y Koo, 2003).

Eckhardt y col. (2002), mostraron que la SM de la leche disminuye en las células Caco-2 la absorción de colesterol en mayor medida que la fosfatidilcolina (PC) del huevo. También observaron que una dieta enriquecida con SM láctea en ratones, incluso a concentraciones del 0,1%, aumenta la excreción fecal de colesterol en comparación con ratones que siguieron una dieta estándar o con ovo-PC.

En un estudio posterior (Noh y Koo, 2004), se observó que la SM láctea es más efectiva en la inhibición de la absorción del colesterol que la SM del huevo. Ambas moléculas presentan un alto grado de saturación de sus ácidos grasos, pero se diferencian marcadamente en su longitud de cadena. La SM de la leche contiene principalmente ácidos grasos saturados de cadena larga (22:0, 23:0 y 24:0). En contraste, la SM del huevo contiene en su mayoría el ácido palmítico, pero relativamente pequeñas cantidades de otros ácidos grasos de cadena larga. Este estudio sugiere que el grado de saturación y la longitud de cadena de los ácidos grasos puede ser determinante en el efecto inhibitorio de la absorción intestinal de colesterol. Las características físicas de la SM de la leche pueden dificultar su hidrólisis e impedir o retardar la transferencia de colesterol de la micela al enterocito en mayor medida que la ovo-SM.

Nyberg y col. (2000) observaron que la cantidad de colesterol absorbida podía depender no sólo de la cantidad de SM ingerida, sino también de la relación SM/colesterol ingerido;

en su estudio, la relación 1:1 fue la que consiguió disminuir más la absorción de colesterol.

Los efectos de los esfingolípidos dietéticos en los niveles tisulares y plasmáticos de colesterol han sido también revisados en estudios en ratones a corto (Imaizumi y col., 1992) y largo plazo (Kobayashi y col., 1997). Los ratones que recibieron durante dos semanas una dieta con colesterol (1%) y esfingolípidos (0,5 y 2%) experimentaron una disminución tanto en la concentración de triglicéridos séricos, como en la esterificación del colesterol hepático, a pesar de que no se describieron cambios en los niveles de colesterol sérico (Imaizumi y col., 1992). En el otro estudio (Kobayashi y col., 1997), los ratones que fueron alimentados durante dos generaciones con una mezcla de esfingolípidos (1%) y aceite de soja (4%) disminuyeron los niveles de colesterol plasmáticos en un 30% en comparación con los animales que recibieron solamente una dieta con un 5% de aceite de soja. Sin embargo, estos ratones mostraron una tendencia a incrementar los niveles hepáticos de triglicéridos y colesterol respecto a los ratones control. Estas observaciones indican que el tiempo que dura la suplementación y la presencia de colesterol dietético afecta al metabolismo del colesterol y de los triglicéridos. Sin embargo, los niveles de los esfingolípidos celulares, como por ejemplo los glucolípidos del cerebro, la ceramida de la epidermis y la SM hepática no se vieron afectados por una alimentación a largo plazo con esfingolípidos, sugiriendo la existencia de un mecanismo homeostático de regulación de los niveles celulares

de esfingolípidos independientemente de la cantidad dietética suministrada (Kobayashi y col., 1997).

Ratones transgénicos portadores del gen de la ApoE-3 (Leiden) fueron utilizados para determinar el efecto de los esfingolípidos dietéticos en los lípidos plasmáticos y en la esteatosis hepática (Duivenvoorden y col., 2006). Estos ratones presentan un perfil de lipoproteínas muy similar al humano y son altamente susceptibles al tratamiento con drogas hipolipidémicas. Tras recibir una dieta tipo occidental (15% manteca de cacao, 0,25% colesterol, 15% aceite de maíz, 40,5% sacarosa, 20% caseína ácida, 10% almidón de maíz y 5,95% celulosa) y una suplementación de esfingolípidos (fitoesfingosina), se vio que los niveles de colesterol y triglicéridos plasmáticos disminuían y se conseguía un efecto hepatoprotector; protegiendo al hígado de la esteatosis inducida por la grasa y el colesterol. Estos datos difieren de los obtenidos con la suplementación de ésteres de estanol, que sólo contribuyen a la disminución del colesterol. La esteatosis hepática se asocia con un aumento de los marcadores de inflamación (proteína sérica amiloide A) y daño hepático (alanina aminotransferasa) y a su vez, todo ello está relacionado con la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico en ratones y humanos (Ioannou y col., 2005; Yki-Jarvinen y Westerbacka, 2005). Adicionalmente, las reacciones inflamatorias están involucradas en procesos arterioscleróticos (Ross, 1999). Por consiguiente, los esfingolípidos dietéticos podrían ser considerados como posible tratamiento para tratar múltiples aspectos del síndrome metabólico, como la dislipemia, la

resistencia a la insulina y la enfermedad cardiovascular (Duivenvoorden y col., 2006).

A pesar de los numerosos estudios realizados en este campo, aún queda por determinar si la ingesta de esfingolípidos afecta a la absorción de colesterol y otros lípidos en humanos.

1.2.1.5. ESFINGOLÍPIDOS Y EFECTO BACTERICIDA

Los esfingolípidos podrían ejercer un efecto protector contra determinados patógenos. Muchos microorganismos (*Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, etc.), toxinas microbianas (toxina del cólera, verotoxina, neurotoxina botulínica tipo 2, etc.) y virus (VIH-1 gp120, virus sendai, etc.) se unen a las células vía esfingolípidos (Vesper y col., 1999). Los esfingolípidos sintéticos inhiben eficazmente la unión de bacterias y virus a las estructuras celulares (Fantini y col., 1997), de ahí que sea plausible que los esfingolípidos procedentes de la dieta compitan con los sitios de unión celular y faciliten la eliminación de microorganismos patógenos del intestino (Versper y col., 1999). Debido a que la adherencia microbiana es el primer paso en una infección (Ofek y col., 2003), esta competición podría ejercer un efecto protector contra los patógenos transportados por alimentos. Esta propiedad de los esfingolípidos puede ser aprovechada en la formulación de productos infantiles. Rueda y col. (1998) describieron que recién nacidos alimentados con fórmulas infantiles suplementadas con gangliósidos, tenían menos *Escherichia coli* y más bifidobacterias en las heces que los grupos control. Sprong, Hulstein y Van der Meer (2001)

encontraron incluso efectos bactericidas *in vitro* en los productos de digestión de los esfingolípidos. Sin embargo, estudios más recientes (Possemiers y col., 2005) indican que bajo condiciones intestinales simuladas, con la presencia de comida y productos de la digestión, no se producen tales efectos.

1.2.2. FOSFOLÍPIDOS

Dentro del grupo de los fosfoglicéridos, la fosfatidilserina (PS) puede ejercer un papel beneficioso en funciones cerebrales como la memoria y el aprendizaje, elevar el humor y combatir el estrés (Kidd, 2000). Investigaciones con animales envejecidos han mostrado que un tratamiento dietético a largo plazo con PS atenúa y quizás, incluso, elimina algunos de los efectos neuronales asociados al envejecimiento (McDaniel y col., 2003). Por ejemplo, la pérdida de espinas dendríticas (sustrato clave de la memoria a largo plazo) que se produce con la edad se podría prevenir con la administración dietética de PS (Nunzi y col., 1987). También se ha descrito que un tratamiento con PS contrarrestaría la reducción de la liberación de neurotransmisores (acetilcolina, dopamina, norepinefrina) que ocurre con el envejecimiento (Casamenti y col., 1991). El efecto del paso de los años no sólo reduce el número de neurotransmisores liberados, sino que también reduce el número de receptores en la superficie de la membrana neuronal que se encargan de recibir los mensajes de los neurotransmisores. La PS ha sido relacionada con la restauración de receptores en ratones mayores (Cohen y Müller, 1992); y también puede ser importante en el mantenimiento de

la estructura general y la salud de la neurona (Toffano, 1987). Dosis elevadas (200 mg/día), mostraron efectos positivos en estudios clínicos con enfermos de Alzheimer (Pepeu y col., 1996). De ahí que, estos fosfolípidos puedan tener efectos beneficiosos en la memoria, aunque los hallazgos preliminares en humanos son aún limitados.

La PC ayuda a la regeneración del hígado después de la ingesta de medicamentos, venenos y alcohol y también después de padecer hepatitis (Kidd, 2002). Además, es una fuente de colina, nutriente clasificado como esencial en humanos. La colina podría promover también la síntesis y transmisión de neurotransmisores importantes para la memoria y puede estar involucrada en el desarrollo del cerebro (Blusztajn, 1998). La PC ha sido utilizada en numerosos estudios para probar su efectividad en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, pero sin resultados satisfactorios. Sin embargo, aún permanece abierta la línea de investigación en personas mayores sin serias enfermedades degenerativas neuronales (McDaniel y col., 2003).

A la fracción de fosfolípidos de la leche también se le ha atribuido un efecto protector sobre la mucosa gástrica por su capacidad para formar una capa hidrofóbica en el epitelio gástrico (Recio y López-Fandiño, 2005). Este efecto se ha demostrado en animales de investigación y en un estudio en humanos en el que se demostraba que los fosfolípidos protegen a la mucosa gástrica de las lesiones producidas por la aspirina (Kivinen y col., 1992).

A pesar de las evidencias existentes acerca del papel de los fosfolípidos en diversos procesos metabólicos con importantes implicaciones en la salud, son necesarias investigaciones complementarias en roedores y, sobre todo en humanos, para aclarar con más detalle las interacciones de estas biomoléculas, así como sus efectos terapéuticos.

1.3. PROPIEDADES TECNOLÓGICAS DE LOS LÍPIDOS POLARES

Los lípidos polares son moléculas anfipáticas comúnmente usadas como aditivos alimentarios en una gran cantidad de productos como margarinas, mayonesas, chocolates, productos de repostería, alimentos instantáneos y también en fármacos. La mayoría de sus aplicaciones tecnológicas se basan en sus propiedades emulsionantes, siendo muy apropiados para la producción y estabilización de emulsiones y espumas.

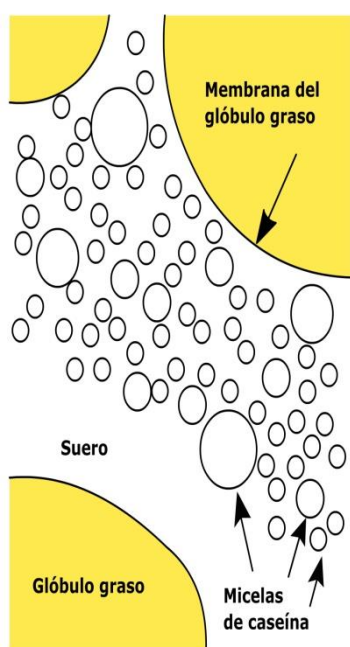
Otros principios fisicoquímicos que contribuyen a su papel tecnológico son su capacidad de hidratación, cristalización, formación de complejos con proteínas o almidón y auto ensamblaje en forma de liposomas (Leser y col., 2006).

Los liposomas son vesículas compuestas principalmente por fosfolípidos organizados en bicapas. Estas vesículas contienen una fase acuosa interna y están suspendidas en otra fase acuosa externa. Se utilizan en la industria farmacéutica para transportar principios activos de la forma más selectiva posible, en un intento de aumentar su eficacia y disminuir los efectos no deseados. En el campo de la alimentación también

tienen importantes aplicaciones, como mejorar la biodisponibilidad de ciertos nutrientes, incrementar la eficacia de los aditivos alimentarios o preservar sabores y aromas (Leser y col., 2006; Singh, 2006).

Los lípidos polares de origen lácteo contienen una parte sustancial de esfingolípidos, que se pueden utilizar como materia prima para la producción de ceramidas (Becart y col., 1990). Debido a su papel en el mantenimiento de la humedad de la epidermis, pueden ser de utilidad en la industria farmacéutica y cosmética para la elaboración de productos destinados al cuidado de la piel y del cabello (Zhang y col., 2006).

1.4. LÍPIDOS POLARES EN LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS



En las últimas décadas se ha documentado la presencia en la grasa de la leche de distintos compuestos lipídicos que ejercen una importante actividad biológica (Parodi 1997 y 1999). Entre los componentes lipídicos y ácidos grasos bioactivos presentes cabe destacar el ácido butírico, el ácido linoleico conjugado y algunos constituyentes de la membrana del glóbulo graso como los lípidos polares.

Figura 1. 9. Emulsión de glóbulos de grasa en leche.

Los lípidos polares constituyen tan solo una pequeña porción de la materia grasa de la leche (0,5-1%). Este porcentaje varía ligeramente según la etapa de lactación, con tendencia a descender a medida que esta avanza, aunque puede volver a incrementarse cerca del final. Sin embargo, la relación entre los lípidos polares permanece relativamente constante. Los principales lípidos polares de la leche son los fosfolípidos, de los cuales, entre un 35 y un 40% se encuentra en la fase acuosa asociados a fragmentos de la membrana de los glóbulos grasos que se encuentran en solución; el resto, está asociado a la membrana de los glóbulos grasos (McGibbon y Taylor, 2003).

La membrana de los glóbulos de grasa deriva de la membrana apical de las células secretoras de la glándula mamaria bovina (Keenan y col., 1983). La orientación de sus lípidos polares, con las cadenas hidrofóbicas hacia el interior y los grupos polares hacia el exterior, origina una estructura en forma de bicapa que constituye la barrera exterior de los glóbulos de grasa, evitando su floculación y coalescencia, además de protegerlos de la acción enzimática de las lipasas.

En cuanto a la composición lipídica de la membrana de los glóbulos grasos, los fosfolípidos constituyen alrededor del 30% del total de lípidos, siendo los más abundantes la PC, la fosfatidiletanolmina (PE) y la SM. La PS y el fosfatidilinositol (PI) están presentes en pequeñas cantidades (Tabla 1.3.). La membrana también contiene cantidades traza de gangliósidos y cerebrósidos (Dewettinck y col., 2008).

Tabla 1. 3. Composición lipídica de la membrana de los glóbulos grasos. (Keenan, 2002).

Componentes	% del total de lípidos
Triglicéridos	62
Diglicéridos	9
Monoglicéridos	0-0.5
Esteroles	0.2-2.0
Ésteres de esteroles	0.1-0.3
Hidrocarburos	1.2
Ácidos grasos libres	0.6-6.0
Lípidos polares	26-31
Esfingomielina ^a	22%
Fosfatidilcolina ^a	36%
Fosfatidiletanolamina ^a	27%
Fosfatidilinositol ^a	11%
Fosfatidilserina ^a	4%
Lisofosfatidilcolina ^a	2%

^a Sobre el porcentaje del total de lípidos polares

Los fosfolípidos están enormemente extendidos en la naturaleza y su composición en ácidos grasos varía mucho en función de la especie, las condiciones ambientales y, dentro de un mismo individuo, también varía con las funciones bioquímicas

y/o fisiológicas en las que intervienen (Graciani, 2006). Los ácidos grasos de longitud de cadena corta y media (C4-C14) característicos de la grasa de la leche, están prácticamente ausentes en la fracción de fosfolípidos. La PE es la más insaturada, seguida del PI y de la PS, mientras que la PC es bastante saturada en comparación con otros fosfoglicéridos. Sin embargo, el patrón de ácidos grasos de la SM es inusual, ya que aunque contiene ácidos grasos de cadena larga, prácticamente todos son saturados (97%). Este alto grado de saturación otorga a la SM la capacidad de formar con el colesterol dominios rígidos en las membranas celulares (Bitman y Wood, 1990; Jensen, 2002).

La membrana de los glóbulos grasos es una estructura muy compleja y, además del componente lipídico, está formada por proteínas, glucoproteínas, enzimas y otros componentes minoritarios (MacGibbon y Taylor, 2003). Algunos de estos componentes han cobrado recientemente interés debido a sus posibles propiedades funcionales, llegándose a proponer la membrana del glóbulo graso como un ingrediente funcional. En la Tabla 1.4. se resumen algunas de las propiedades beneficiosas asociadas a estos componentes.

Tabla 1. 4. Potenciales efectos beneficiosos de diferentes componentes de la membrana del glóbulo graso. Adaptado de Spitsberg (2005).

COMPONENTES	EFFECTOS BENEFICIOSOS
Breast Cancer 1	Inhibidor del cáncer de mama
Breast Cancer 2	Inhibidor del cáncer de mama
Butirofilina	Supresión de la esclerosis múltiple
Xantina oxidasa	Agente bactericida
Proteína fijadora de ácidos grasos	Inhibidor del crecimiento celular
Inhibidor de la beta-glucuronidasa	Inhibidor del cáncer de colon
Inhibidor de <i>Helicobacter pylori</i>	Prevención de enfermedades gástricas
Vitamina E y carotenoides	Antioxidantes

1.5. BIBLIOGRAFÍA

Andrieu-Abadie, N., Levade, T. (2002). Sphingomyelin hydrolysis during apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1585: 126-134.

Becart, J., Chavalier, C., Biesse, J.P. (1990). Quantitative analysis of phospholipids by HPLC with light scattering detector: application to raw materials for cosmetic use. *Journal of High Resolution Chromatography*. 13: 126-129.

Bitman, J., Wood, D.L. (1990). Changes in milk fat phospholipids during lactation. *Journal of Dairy Science*. 73(5): 1208-1216.

Blusztajn, J.K. (1998). Developmental neuroscience: Enhanced: Choline, a vital amine. *Science*. 281(5378): 794-795.

Brown, D.A., London, E. (2000). Structure and Function of Sphingolipid- and Cholesterol-rich Membrane Rafts. *Journal of Biological Chemistry*. 275(23): 17221-17224.

Casamenti, F., Scali, C., Pepey, G. (1991). Phosphatidylserine reverses the age-dependent decrease in cortical acetylcholine release: a microdialysis study. *European Journal of Pharmacology*. 194: 11-16.

Chen, H., Born, E., Mathur, S.N., Johlin, F.C., Field, J. (1992). Sphingomyelin content of intestinal cell membranes regulates cholesterol absorption. *The Biochemical Journal*. 287: 771-777.

Cohen, S.A., Müller, W.E. (1992). Age-related alterations of NMDA-receptor properties in the mouse forebrain: partial restoration by chronic phosphatidylserine treatment. *Brain Research*. 584: 174-180.

Dewettinck, K., Rombaut, R., Thienpont, N., Le, T.T., Messens, K., Van Camp, J. (2008). Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *International Dairy Journal*. 18(5): 436-457.

Dillehay, D.L., Webb, S.K., Schmelz, E., Merrill Jr, A.H. (1994). Dietary Sphingomyelin Inhibits 1, 2-Dimethylhydrazine-Induced Colon Cancer in CF1 Mice. *The Journal of Nutrition*. 124(5): 615-620.

Duan, R.D., Hertevig, E., Nyberg, L., Hauge, T., Sternby, B., Lillineau, J., Farooqi, A., Nilsson, A. (1996). Distribution of alkaline sphingomyelinase activity in human beings and animals.

Tissue and species differences. *Digestive Diseases and Sciences*. 41: 1801-1806.

Dudeja, P.K., Dahiya, R., Brasitus, T.A. (1986). The role of sphingomyelin synthase and sphingomyelinase in 1,2-dimethylhydrazine-induced lipid alterations of rat colonic plasma membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 863: 309-312.

Duivenvoorden, I., Voshol, P.J., Rensen, P.C., van Duyvenvoorde, W., Romijn, J.A., Emeis, J.J., Havekes, L.M., Nieuwenhuizen, W.F. (2006). Dietary sphingolipids lower plasma cholesterol and triacylglycerol and prevent liver steatosis in APOE*3Leiden mice. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 84(2): 312-321.

Eckhardt, E.R.M., Wang, D.Q.H., Donovan, J.M., Carey, M.C. (2002). Dietary sphingomyelin suppresses intestinal cholesterol absorption by decreasing thermodynamic activity of cholesterol monomers. *Gastroenterology*. 122 (4): 948-956.

Endo, K., Igarashi, Y., Nisar, M., Zhou, Q.H., Hakomori, S.I. (1991). Cell membrane signaling as target in cancer therapy: inhibitory effect of *N,N*-dimethyl and *N,N,N*-trimethyl sphingosine derivatives on in vitro and in vivo growth of human tumor cells in nude mice. *Cancer Research*. 51: 1613-1618.

Fantini, J., Hammache, D., Delézay, O., Yahi, N., André-Barrès, C., Ricco-Lattes, I., Lattes, A. (1997). Synthetic soluble analogs of galactosylceramide (Gal-Cer) bind to the V3 domain of HIV-1 gp120 and inhibit HIV-1-induced fusion of entry. *Journal of Biological Chemistry*. 272(11): 7245-7252.

Graciani, E. (2006). Los aceites y grasas: composición y propiedades. (1ª ed.). Madrid: Mundi-Prensa; AMV Ediciones. P33-34.

Hanada, K., Nishijima, M., Kiso, M., Hasegawa, A., Fujita, S., Ogawa, T., Akamatsu, Y. (1992). Sphingolipids are essential for the growth of Chinese hamster ovary cells. Restoration of the growth of a mutant defective in sphingoid base biosynthesis by exogenous sphingolipids. *Journal of Biological Chemistry*. 267: 23527-23533.

Hannun, Y.A. (1994). The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *Journal of Biological Chemistry*. 269: 3125-3128.

Imaizumi, K., Tominaga, A., Sato, M., Sugano, M. (1992). Effects of dietary sphingolipids on the levels of serum and liver lipids in rats. *Nutrition Research*. 12(4-5): 543-548.

Ioannou, G.N., Weiss, N.S., Boyko, E.J., Kahn, S.E., Lee, S.P. (2005). Contribution of metabolic factors to alanine aminotransferase activity in persons with other causes of liver disease. *Gastroenterology*. 128: 627-635.

Jensen, R.G., Newburg, D.S. (1995). Bovine milk lipids. En: Jensen RG, editor, *Handbook of Milk Composition*. New York: Academic Press. P543-575.

Jensen, R.G. (2002). The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science*. 85(2): 295-350.

Keenan, T.W., Dylewski, D.P., Woodford, T.A., Ford, R.H. (1983). Origin of milk fat globules and the nature of the milk fat

globule membrane. En: Fox PF, editor. *Developments in Dairy Chemistry*. New York: Applied Science Publisher. P83-118.

Keenan, T.W. (2002). Origin Milk Fat Globule Membrane. En: Roginski H, Fuquay JW, Fox P, editores. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Amsterdam: Academic Press P1568-1576.

Kidd, P.M. (2000). Dietary phospholipids as anti-aging nutraceuticals. En: Klatz RA, Goldman R, editores. *Anti-Aging Medical Therapeutics*. Chicago, IL: Health Quest Publications. P282-300.

Kidd, P.M. (2002). Phospholipids: Versatile nutraceutical ingredients for functional foods. *Functional Foods and Nutraceuticals*. 12: 30–40.

Kivinen, A., Tarpilla, S., Salminen, S., Vapaatalo, H. (1992). Gastroprotection with milk phospholipids: a first human study. *Milchwissenschaft*. 47(11): 694-696.

Kobayashi, T., Shimizugawa, T., Osakabe, T., Watanabe, S., Okuyama, H. (1997). A long-term feeding of sphingolipids affected the level of plasma cholesterol and hepatic triacylglycerol but not tissue phospholipids and sphingolipids. *Nutrition Research*. 17(1): 111-114.

Lemonnier, L.A., Dillehay, D.L., Vespremi, M.J., Abrams, J., Brody, E., Schmelz, E.M. (2003). Sphingomyelin in the suppression of colon tumors: prevention versus intervention. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 419(2): 129-138.

Leser, M.E, Sagalowicz, L., Michel, M., Watzke, H.J. (2006). Self-assembly of polar food lipids. *Advances in Colloid and Interface Science*. 123-126: 125-136.

MacGibbon, A.K.H., Taylor, M.W. (2003). Phospholipids. En: Roginski H, Fuquay JW, Fox PF, editores. Encyclopedia of Dairy Sciences Vol. III. Amsterdam: Academic Press. P1559-1567.

Mataix, J., Sánchez de Medina, F. Lípidos. (2002). En: Mataix J, editor. Nutrición y Alimentación Humana Vol. I: Nutrientes y alimentos. Madrid: Ergon P77-79.

McDaniel, M.A., Maier, S.F., Einstein, G.O. (2003). "Brain-specific" nutrients: a memory cure? Nutrition. 19(11-12): 957-975.

Merrill, A.H., Nixon, D.W., Williams, R.D. (1985). Activities of serine palmitoyl-transferase (3-Ketosphinganine synthase) in microsomes from different rat tissues. Journal of Lipid Research. 26: 617-622.

Merrill, A.H., Schmelz, E.M., Dillehay, D.L., Spiegel, S., Shayman, J.A., Schroeder, J.J., Riley, R.T., Wang, E. (1997). Sphingolipids. The enigmatic lipids class: biochemistry, physiology and pathophysiology. Toxicology and Applied Pharmacology. 142: 208-225.

Merrill, A.H., Schmelz, E.M., Sullards, M.C, Dillehay, D.L. (2001). Sphingolipids: Novel inhibitors of colon carcinogenesis: Dairy nutrition for a healthy future. Bulletin International Dairy Federation. 363: 27-29.

Merrill, A.H., Schmelz, E.M., Wang, E., Schroeder, J.J., Dillehay, D.L., Riley, R.T. (1995). Role of Dietary Sphingolipids and Inhibitors of Sphingolipid Metabolism in Cancer and Other Diseases. The Journal of Nutrition. 125: 1677-1682.

Nagiec, M.M, Lester RL, Dickson RC. (1996). Sphingolipid synthesis: identification and characterisation of mammalian cDNA encoding the Lcb2 subunit of serine palmitoyltransferase. *Gene* 177: 237-241.

Nilsson, Å. (1968). Metabolism of sphingomyelin in the intestinal tract of the rat. *Biochimica et Biophysica Acta*. 164: 575-584.

Noakes, M., Clifton, P., Ntanios, F., Shrapnel, W., Record, I., McInerney, J. (2002). An increase in dietary carotenoids when consuming plant sterols or stanols is effective in maintaining plasma carotenoid concentrations. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 75: 79-86.

Noh, S.K., Koo, S.I. (2003). Egg Sphingomyelin Lowers the Lymphatic Absorption of Cholesterol and α -Tocopherol in Rats. *The Journal of Nutrition*. 133: 3571-3576.

Noh, S.K., Koo, S.I. (2004). Milk Sphingomyelin is more effective than egg sphingomyelin in inhibiting intestinal absorption of cholesterol and fat in rats. *The Journal of Nutrition*. 134: 2611-2616.

Nunzi, M.G., Milan, F., Guidolin, D., Toffano, G. (1987). Dendritic spine loss in hippocampus of aged rats: effects of brain phosphatidylserine administration. *Neurobiol Aging*. 8(6): 501-510.

Nyberg, L., Duan, R., Nilsson, A. (2000). A mutual inhibitory effect on absorption of sphingomyelin and cholesterol. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 11: 244-249.

Nyberg, L., Nilsson, Å., Lundgren, P., Duan, R.D. (1997). Localization and capacity of sphingomyelin digestion in the rat

intestinal tract. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 8: 112-118.

Ofek, I., Hasy, D.L., Sharon, N. (2003). Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 38: 181-191.

Olivera, A., Spiegel, S. (1993). Sphingosine-1-phosphate as a second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature*. 365: 557-560.

Parodi, P.W. (1997). Cows' milk fat components as potential anticarcinogenic agents. *The Journal of Nutrition*. 127(6): 1055-1060.

Parodi, P.W. (1999). Conjugated Linoleic Acid and Other Anticarcinogenic Agents of Bovine Milk Fat. *Journal of Dairy Science*. 82(6): 1339-1349.

Pepeu, G., Pepeu, I.M., Amaducci, L. (1996). A review of phosphatidylserine pharmacological and clinical effects. Is phosphatidylserine a drug for the ageing brain? *Pharmacological Research*. 33: 73-80.

Pettus, B., Chalfant, C., Hannun, Y. (2002). Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1585: 114-125.

Pfeuffer, M., Schrezenmeir, J. (2001). Dietary sphingolipids: Metabolism and potential health implications. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*. 53: 31-42.

Possemiers, S., Van Camp, J., Bolca, S., Verstraete, W. (2005). Characterization of the bactericidal effect of dietary sphingosine and its activity under intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 105: 59-70.

Powell, S.M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T.M., Hamilton, S.R., Thibodeau, S.N., Vogelstein, B., Kinzler, K.W. (1992). APC mutations occur early during colorectal carcinogenesis. *Nature*. (Lond.) 359: 235-237.

Recio, I., López-Fandiño, R. (2005). Efectos en la salud de los ingredientes lácteos funcionales. *Alimentación, Nutrición y Salud*. 4: 121-131.

Riboni, L., Viani, P., Bassi, R., Prinetti, A., Tettamanti, G. (1997). The role of sphingolipids in the process of signal transduction. *Progress in Lipid Research*. 36: 153-195.

Rombaut, R., Camp, J.V., Dewettinck, K. (2005). Analysis of phospho- and sphingolipids in dairy products by a new HPLC method. *Journal of Dairy Science*. 88: 482-488.

Ross, R. (1999). Atherosclerosis - an inflammatory disease. *New England Journal of Medicine*. 340: 115-126.

Rueda, R., Sabatel, J.L., Maldonado, J., Molina-Font, J.A., Gil, A. (1998). Addition of gangliosides to an adapted milk formula modifies levels of fecal *Escherichia coli* in preterm newborn infants. *Journal of Pediatrics*. 133: 90-94.

Sadahira, Y., Ruan, F., Hakomori, S., Igarashi, Y. (1992). Sphingosine 1 phosphate, a specific endogenous signaling molecule controlling cell motility and tumor cell invasiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89: 9686-9690.

Schmelz, E.M., Bushnev, A.S., Dillehay, D.L., Liotta, D.C., Merrill, A.H. (1997). Suppression of aberrant colonic crypt foci by synthetic sphingomyelins with saturated or unsaturated

sphingoid base backbones. *Nutrition and Cancer –An International Journal*. 28(1): 81-85.

Schmelz, E.M., Crall, K.J., Larocque, R., Dillehay, D.L., Merrill, A.H. (1994). Uptake and Metabolism of Sphingolipids in Isolated Intestinal Loops of Mice. *The Journal of Nutrition*. 124: 702-712.

Schmelz, E.M., Dillehay, D.L., Webb, S.K., Reiter, A., Adams, J., Merrill, A.H. (1996). Sphingomyelin consumption suppresses aberrant crypt foci and increases the proportion of adenomas versus adenocarcinomas in CF1 mice treated with 1,2-dimethylhydrazine: implications for dietary sphingolipids and colon carcinogenesis. *Cancer Research*. 56: 4936-4941.

Schmelz, E.M., Dombrink-Kurtzman, M.A., Roberts, P.C., Kozutsumi, Y., Kawasaki, T., Merrill, A.H. (1998). Induction of apoptosis by Fumonisin B1 in HT-29 cells is mediated by the accumulation of endogenous free sphingoid bases. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 148: 252-260.

Schmelz, E.M., Sullards, M.C., Dillehay, D.L., Merrill, A.H. (2000). Colonic Cell Proliferation and Aberrant Crypt Foci Formation Are Inhibited by Dairy Glycosphingolipids in 1,2-Dimethylhydrazine-Treated CF1 Mice. *The Journal of Nutrition*. 130: 522-527.

Schwartz, G., Ward, D., Saltz, L., Casper, E., Spiess, T., Mullen, E., Woodworth, J., Venuti, R., Zervos, P., Storniolo, A., Kelsen, D. (1997). A pilot clinical/pharmacological study of the protein kinase C-specific inhibitor safinol alone and in combination with doxorubicin. *Clinical Cancer Research*. 3: 537-543.

Singh, H. (2006). The milk fat globule membrane: A biophysical system for food applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 11(2-3): 154-163.

Spitsberg, V.L. (2005). Invited Review: Bovine Milk Fat Globule Membrane as a Potential Nutraceutical. *Journal of Dairy Science*. 88: 2289-2294.

Sprong, R.C., Hulstein, M.F.E., Van der Meer, R. (2001). Bactericidal activities of milk lipids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45: 1298-1301.

Stevens, V.L., Nimkar, S., Jameson, W.C., Liotta, D.C., Merrill, A.H. (1990). Characteristics of the growth inhibition and cytotoxicity of long-chain (sphingoid) bases for Chinese hamster ovary cells: evidence for an involvement of protein kinase C. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1051: 37-45.

Stevens, V.L., Tang, J. (1997). Fumonisin B1-induced sphingolipid depletion inhibits vitamin uptake via the glycosylphosphatidylinositol-anchored folate receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 272: 18020-18025.

Toffano, G. (1987). The therapeutic value of phosphatidylserine effect in the aging brain. En: Hanin I, Ansell GB, editores. *Lecithin: technological, biological, and therapeutic aspects*. New York: Plenum Press. P137.

van Meer, G., Lisman, Q. (2002). Sphingolipid Transport: Rafts and Translocators. *Journal of Biological Chemistry*. 277: 25855-25858.

Vesper, H., Schmelz, E., Nikolova-Karakashian, M.N., Dillehay, D.L., Lynch, D.V., Merrill, A.H. (1999). Sphingolipids in

food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition. The Journal of Nutrition. 129: 1239-1250.

Wright, S.C., Zheng, H., Zhong, J. (1996). Tumor cell resistance to apoptosis due to a defect in the activation of sphingomyelinase and the 24 kDa apoptotic protease (AP24). Faseb Journal. 10(2): 325-332.

Yki-Jarvinen, H., Westerbacka, J. (2005). The fatty liver and insulin resistance. Current Molecular Medicine. 5: 287-295.

Zhang, L., Hellgren, L.I., Xu, X.B. (2006). Enzymatic production of ceramide from sphingomyelin. Journal of Biotechnology. 123: 93-105.





2. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO: MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y CROMATOGRÁFICO



2.1. INTRODUCCIÓN

La mayoría de los fosfolípidos presentes en los alimentos están localizados en estructuras membranosas, interactuando con compuestos de una compleja matriz; de ahí que sea necesario, antes del análisis, un paso previo de extracción (Rombaut y col., 2005).

Los métodos de extracción más frecuentemente empleados son los de Folch y col. (1956) y Bligh y Dyer (1959) con cloroformo-metanol o los de Hara y Radin (1978) que emplean una mezcla menos tóxica de hexano-isopropanol. La combinación de un disolvente más polar, como por ejemplo un alcohol, con otro de alta solubilidad en la fracción lipídica, como el cloroformo, favorece la liberación de los fosfolípidos que se encuentran en complejos lipoproteicos. La aplicación de lavados con agua o soluciones salinas permite la eliminación de los contaminantes no lipídicos (Nollet, 1992).

Evaluaciones, modificaciones y alternativas de diferentes métodos de extracción de fosfolípidos han sido planteadas por Theodet y Gandemer (1991), Shaikh (1994), Vaghela y Kilara (1995), Heitmann y col. (1996), Rombaut y col. (2005), y más recientemente por Castro-Gómez y col. (2014), que utilizan una extracción líquida a presión, consiguiendo una eficiente capacidad de extracción en menos tiempo y con menor consumo de reactivos.

Después de la extracción, con frecuencia se realiza un paso de purificación o fraccionamiento con cartuchos de extracción en fase sólida, columna cromatográfica o cromatografía en capa fina (TLC) (Avalli y Contarini, 2005).

Una vez finalizada la extracción, los fosfolípidos se identifican y cuantifican mediante análisis cromatográfico. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada al detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD) se ha situado como el método más interesante en los últimos años.

Se han descrito numerosos procedimientos para separar fosfolípidos por HPLC, siendo la separación en fase normal con fase estacionaria de sílice la más frecuente (Becart y col., 1990; Rombaut y col., 2005 y 2007; López y col., 2008); aunque la sílice modificada también ha tenido aplicaciones, particularmente las columnas con grupos diol (Pang y col., 2008; Uran y col., 2001), cianopropil (Samet y col., 1989), aminopropil (Carunchio y col., 1984) y polivinil alcohol (Fagan y Wijesundera, 2004). Con respecto a la fase móvil, las mezclas de solventes más utilizadas son (Hvattunm y col. 2006):

- Hexano:isopropanol:agua/ácidos/bases.
- Acetonitrilo:metanol:agua/ácidos/bases.
- Cloroformo:metanol:amoníaco.

La mayoría de los métodos cromatográficos más recientemente usados para la separación de fosfolípidos en productos lácteos se basan en el método de Becart y col. (1990), que emplea un buffer a pH >7, con un modificador alcalino (triethylamina o amoníaco). Mediante este procedimiento se consigue una excelente separación de los fosfolípidos de la leche, pero un pH tan elevado disuelve la sílice y, por lo tanto, la vida útil de la columna se ve muy reducida. Una modificación de este procedimiento, publicada por Rombaut y col. (2005), consigue la separación de GluCer, LacCer, PE, PI, PS, PC y SM

en diferentes muestras de productos lácteos, en menos de 21 minutos, a la vez que prolonga la vida útil de la columna al utilizar un buffer a pH 3 con ácido fórmico y trietilamina.

Para el análisis cromatográfico de grasas y aceites, el ELSD ha supuesto un gran avance para la detección de estas sustancias y, desde su introducción en 1978, ha revolucionado el análisis de lípidos por HPLC (Vázquez y col., 2007). Esta técnica (Figura 2.1.) se basa en que el disolvente utilizado como fase móvil, tras atravesar la columna, se nebuliza mediante una corriente de gas (aire o nitrógeno). Las gotas más grandes se adhieren a las paredes del tubo de cristal y drenan al tubo del sifón, mientras que las partículas más finas entran en el tubo de la deriva y son arrastradas por el flujo del gas hacia la zona caliente situada antes de la cámara de detección. La eficacia de la evaporación depende de la forma del tubo y de la temperatura que se alcance. El disolvente se evapora, mientras que el analito no se evapora y queda en forma nebulizada. La salida del tubo de deriva está conectada directamente con la celda de detección, que contiene una lámpara halógena de tungsteno y un foto-multiplicador. Cuando el gas transportador que contiene el analito llega a este punto la luz se dispersa, dando lugar a un fenómeno de refracción y reflexión. La intensidad de la luz dispersada es función de la cantidad de analito, y suele seguir una relación exponencial, que se puede expresar mediante la siguiente ecuación:

$$I = km^b$$

donde I es la intensidad de la luz, m la masa total de las partículas dispersadas, y k y b son constantes dependientes de

las condiciones experimentales, como la temperatura, y de las características de la fase móvil.

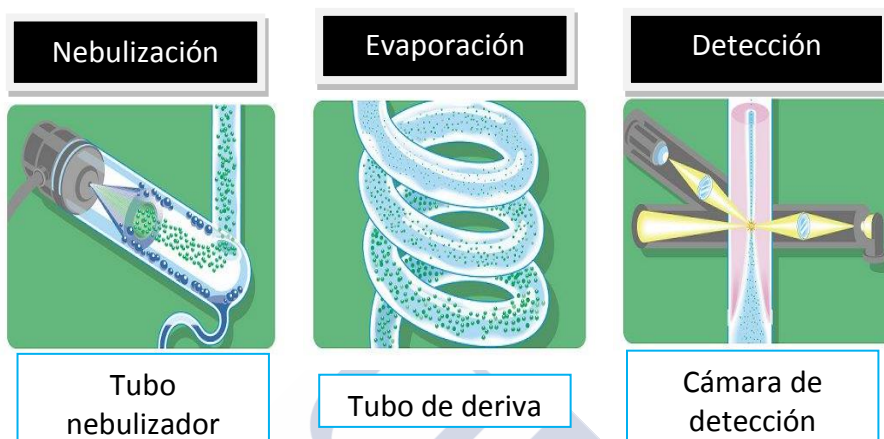


Figura 2.1. Esquema de funcionamiento del ELSD.

Este detector da excelentes resultados bajo condiciones de elución en gradiente, es simple y de fácil uso. Una de las principales ventajas del ELSD frente a otros detectores como los de fluorescencia, UV-Visible o fotodiodos es su enorme versatilidad, ya que es un detector de masa y permite la detección y la cuantificación de analitos, tengan o no grupos cromóforos en su estructura. La sensibilidad del ELSD es comparable a la de un detector de índice de refracción, pero sin verse afectado por los cambios en la fase móvil (elución en gradiente) o por variaciones pequeñas en la temperatura ambiente, que son los principales inconvenientes del detector de índice de refracción (Vázquez y col., 2007).

La espectrometría de masas (MS) y la resonancia magnética nuclear ^{31}P (^{31}P - NMR) son otros métodos propuestos para la determinación de fosfolípidos.

La MS ofrece una interesante alternativa para identificar las diferentes especies moleculares. La introducción de la ionización por electrospray ha minimizado algunos de los inconvenientes asociados a la ionización química rápida del bombardeo del átomo, como la descomposición molecular de las especies iónicas durante la ionización. La MS permite gran capacidad de identificación, alta sensibilidad, y especificidad (Pulfer y Murphy, 2003; Wang y col., 2004).

El método ^{31}P -NMR es aplicable para los lípidos que contienen fósforo, obteniéndose señales únicas para las diferentes clases de fosfolípidos. Esta técnica requiere un pretratamiento mínimo de la muestra ya que cada fosfolípido se caracteriza por su frecuencia de resonancia específica, producida por las diferentes estructuras químicas (Hatzakis y col., 2008). La ^{31}P -NMR es ideal para certificar la composición de los estándares, de cuya calidad depende la exactitud de los resultados obtenidos por HPLC o TLC (Rombaut y Dewettinck, 2006).

2.2. OBJETIVOS

El objetivo de este estudio es optimizar una metodología analítica para la determinación cualitativa y cuantitativa de los fosfolípidos presentes en la leche y productos lácteos:

fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina y esfingomielina.

2.3. MATERIAL Y MÉTODOS

2.3.1. MUESTRAS

Las muestras de leche mazada cruda y queso fresco elaborado a partir de leche mazada (QFLM) utilizadas para la validación del método analítico fueron suministradas por Innolact S.L. (Castro Riberas de Lea, Lugo).

Las muestras de leche cruda fueron suministradas por Leche de Galicia S.L. (Vilalba, Lugo).

Las muestras se recibieron refrigeradas y en el caso de la leche mazada cruda y la leche cruda se congelaron a -42 °C hasta su extracción.

2.3.2. ANÁLISIS DE LA GRASA

La determinación de la materia grasa de la leche y leche mazada se lleva a cabo por espectroscopía infrarroja, mediante un Milkoscan FT2 (Foss Electric LTDA, Dinamarca) según la norma FIL-IDF 141C (2000). La muestra se calienta a 40 °C antes de introducirla en el analizador.

La determinación de la materia grasa en el QFLM se hace por duplicado según el método Van Gulik, FIL-IDF 222 (2008), para ello se llevan a cabo las siguientes etapas:

1. Se pesan 3 g de muestra en la copa del butirómetro (Funke-Gerber, Berlín, Alemania).

2. Se introduce la copa en el butirómetro y se le añade ácido sulfúrico (Panreac, Barcelona, España) al 62,5% (m/m) hasta cubrir la muestra.

3. Se agita con cuidado, teniendo en cuenta la elevación de la temperatura, hasta que la muestra quede completamente disuelta.

4. Se añade de nuevo ácido sulfúrico al 62,5% hasta la mitad de la escala del butirómetro.

5. Se añade 1 mL de alcohol isoamílico (Panreac), se tapa el butirómetro y se mezcla.

6. Se centrifuga (Lacta, modelo LB8C, Madrid, España) durante 5 min a 65 °C.

7. Se introduce el butirómetro en un baño de agua a 65 °C durante 5 min y se lee el porcentaje de grasa en la escala del butirómetro.

2.3.3. EXTRACCIÓN

2.3.3.1. REACTIVOS

- Ácido Clorhídrico (HCL) 25% (WWR, Fontenay sous Bois, Francia).
- Agua destilada.
- Cloroformo PA-ISO (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).
- Cloruro de sodio (NaCl) PA-ACS-ISO (Panreac).
- Metanol PA-ISO (Sigma-Aldrich).
- Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) PA-ACS-ISO (Panreac).

2.3.3.2. INSTRUMENTACIÓN Y MATERIAL

- Centrífuga Digiten 21 R (Ortoalresa, Madrid, España).
- Rotavapor (Büchi, Uster, Suiza).
- Balanza de precisión (Mettler mod. AE-200, Greifensee, Suiza).
- Material de uso corriente en el laboratorio.

2.3.3.3. MÉTODO DE EXTRACCIÓN

Para la extracción de las muestras se ha aplicado, con ligeras modificaciones, el método de extracción descrito por Rombaut y col. (2005):

1. En función del contenido graso y del contenido en fosfolípidos esperado en la muestra, se pesan 5 ó 10 g y se diluyen en 20 mL de agua destilada. Si es necesario, se aplica agitación con o sin calor para homogenizar la mezcla.
2. La muestra se lleva a un embudo de decantación.
3. Se adicionan 80 mL de cloroformo:metanol 2:1 (vol/vol).
4. Se agita durante 2 min.
5. Si no se forma emulsión, tras un corto periodo de reposo, se procede a retirar la fase inferior (fase transparente de cloroformo). Si tras la agitación se forma emulsión, se centrifuga (318 "g", 10 °C, 15 min) y posteriormente se retira la fase inferior.

6. Se añaden a la fase superior, que permanece en el embudo, 40 mL de cloroformo:metanol 20:1 (vol/vol). Se procede de igual forma que lo descrito en el punto 5.
7. Se repite el paso anterior: adición a la fase superior que permanece en el embudo de 40 mL de cloroformo:metanol 20:1 (vol/vol) y se repite de nuevo el punto 5.
8. Se añaden 40 mL de cloroformo:metanol:solución 1 M de HCL y 0,9% NaCl (86:14:1) (vol/vol/vol) a la fase que permanece en el embudo. Se procede igual que como se describió en el punto 5, prolongando el tiempo de centrifugado (318 "g"; 10 °C, 30 min) para conseguir una separación de fases lo más completa posible.
9. Una vez extraídas las 4 fases, se juntan, se filtran añadiendo un poco de sulfato de sodio anhidro, y se evaporan usando un rotavapor a vacío a 35 °C.
10. La fase grasa que queda sin evaporar en el rotavapor se disuelve en 5 ó 10 mL de cloroformo:metanol 88:12 (vol/vol), se transfiere a un bote de cristal ámbar y se almacena en el congelador a -42 °C.

Cada muestra se extrae por duplicado. Cada extracción se inyecta por duplicado o triplicado. Antes de pinchar las muestras se filtran con un filtro de jeringa de 0,20 µm de tamaño de poro (Sartorius Stedim Bioych, Gotinga, Alemania).



Figura 2.2. Proceso de extracción

2.3.4. CALIBRACIÓN

En la Tabla 2.1. se indican los patrones empleados para hacer las rectas de calibrado, que corresponden a los principales fosfolípidos presentes en leche.

Tabla 2.1. Patrones empleados para la calibración.

PATRÓN	ORIGEN	PRESENTACIÓN	PROVEEDOR
PE	Bovino (cerebro)	Polvo	Larodan (Estocolmo, Suecia)
PI	Bovino (corazón)	Disolución	Larodan
PC	Bovino (cerebro)	Disolución	Larodan
PS	Bovino (cerebro)	Polvo	Sigma-Aldrich
SM	Bovino (cerebro)	Polvo	Sigma-Aldrich

La identificación de los compuestos se realiza por comparación de los tiempos de retención de los picos de la muestra con los tiempos de retención de los patrones (Tabla 2.2.).

Tabla 2.2. Tiempo de retención de los fosfolípidos.

COMPUESTO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min.)
PE	9,307
PI	13,539
PC	15,314
PS	16,435
SM	17,443

Para la cuantificación se procede a la obtención de curvas de calibrado con disoluciones multipatrón, a 6 niveles de concentraciones crecientes. Las concentraciones ($\mu\text{g/mL}$) para cada uno de los compuestos son las siguientes: PE 50, 150, 250, 350, 450, 550; PI 10, 20, 40, 60, 80, 100; PC 40, 120, 200, 280, 340, 400; PS 15, 25, 45, 65, 85, 105; SM 50, 100, 150, 200, 250, 300. El disolvente empleado para preparar las disoluciones es cloroformo: metanol 88:12. Cada disolución multipatrón se pincha por duplicado, triplicado o cuadruplicado hasta obtener unos valores de áreas con un coeficiente de variación (CV) inferior al 10%. Las rectas de calibración se calculan aplicando logaritmos a los valores del área y de la cantidad inyectada en la columna.

2.3.5. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

2.3.5.1. FASES MÓVILES

- FASE MÓVIL A: cloroformo Chromasolv HPLC 99,8% (Sigma-Aldrich).
- FASE MÓVIL B: metanol Chromasolv HPLC 99,9% (Sigma-Aldrich).
- FASE MÓVIL C: disolución de ácido fórmico al 0,5% ajustado a pH 6 con amoníaco. Para la preparación del buffer se utiliza agua de grado HPLC (Panreac), ácido fórmico 98% PA-ACS (Panreac) y amoníaco (máximo 33% NH₃) (Sigma-Aldrich). Una vez preparada la mezcla, se filtra a través de un filtro de membrana de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0,20 µm (Sartorius Stedim Bioych).

2.3.5.2. EQUIPO CROMATOGRÁFICO Y MATERIAL

- Equipo HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japón) formado por:
 - Procesador de datos CBM-20A.
 - Panel de control LC-10AD.
 - Módulo de gradiente a baja presión FCV-10AL.
 - Horno CTO-10AS.
 - Inyector manual Rheodyne.
 - Desgasificador en línea GT-154.
- Detector ELSD-LTII (Shimadzu).
- Columna cromatográfica: Prevail Silica 150 × 3 mm con partículas de 3 µm (Grace Davison, Deerfield, IL, USA).

- Precolumna : Prevail Silica All Guard 3,0 × 7,5 mm (Grace Davison).
- Software Shimadzu LCsolution versión 1.23.
- Jeringa 50 µm (Hamilton, Suiza).
- Filtro de fase móvil Hastelloy C para la línea A de cloroformo.
- Nitrógeno Alphagaz (Air Liquide, Madrid, España).



Figura 2.3. Equipo HPLC-ELSD

2.3.5.3. PROCEDIMIENTO CROMATOGRÁFICO

Partiendo de los métodos propuestos por Becart y col. (1990) y Rombaut y col. (2005) se realizaron sucesivas pruebas, tanto de modificación de fases móviles como de gradiente, siendo las condiciones finales establecidas las siguientes:

Gradiente:

- Tiempo 0 min.: 80:19.5:0.5 (vol/vol/vol) cloroformo:metanol:buffer (ácido fórmico al 0,5% hasta pH 6 con amoníaco).
- Tiempo 17 min: 60:33:7 (vol/vol/vol).
- Tiempo 20 min: la fase móvil se restablece a las condiciones iniciales.
- Tiempo 35 min: acondicionamiento de la columna para la nueva inyección.

Flujo de la fase móvil: 0,5 mL/min

Volumen inyectado de muestra: 20 µL

Temperatura del horno: 35 °C

Parámetros del detector ELSD:

- Temperatura: 50 °C
- Presión de nitrógeno: 3,5 bar
- Ganancia: 3

2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO

En la primera fase de optimización de las condiciones cromatográficas se aplicó un gradiente de fases móviles compuesto de cloroformo, metanol y buffer 1 M de ácido fórmico ajustado a pH 3 con trietilamina, descrito por Rombaut y col. (2005). Con este procedimiento, se consigue la separación de los cinco principales fosfolípidos (PE, PI, PS, PC y SM) y dos glucolípidos, LacCer y GluCer. Sin embargo, la resolución entre los picos correspondientes a PS y PI no fue satisfactoria por lo

que se hicieron varias modificaciones hasta conseguir su total separación.

En primer lugar, se modificó el pH y la concentración del buffer, ya que la adición de iones orgánicos a la fase móvil mejora la resolución de los fosfolípidos ácidos como PS y PI (Christie, 1986). Se probaron buffers con diferente pH (3,5 y 4,0) y a diferentes concentraciones de ácido fórmico (1 M y 2 M), conservando el mismo gradiente descrito en el método de Rombaut y col. (2005).

Con la modificación del buffer no se consiguió mejorar la separación de PS y PI, por lo que, posteriormente, las pruebas se encaminaron a variar el gradiente empleando el buffer inicial (1 M de ácido fórmico, pH 3,0).

Finalmente, las condiciones que permitieron la separación de todos los compuestos fueron las siguientes:

- Tiempo 0 min: 87.5:12:0.5 (vol/vol/vol)
cloroformo:metanol:buffer
- Tiempo 20 min: 28:63:9 (vol/vol/vol)
cloroformo:metanol:buffer
- Tiempo 30 min: la fase móvil se restablece a las condiciones iniciales.

En la Figura 2.4. se muestra un cromatograma de una disolución multipatrón con los fosfolípidos de interés, obtenido con las condiciones de separación arriba indicadas.

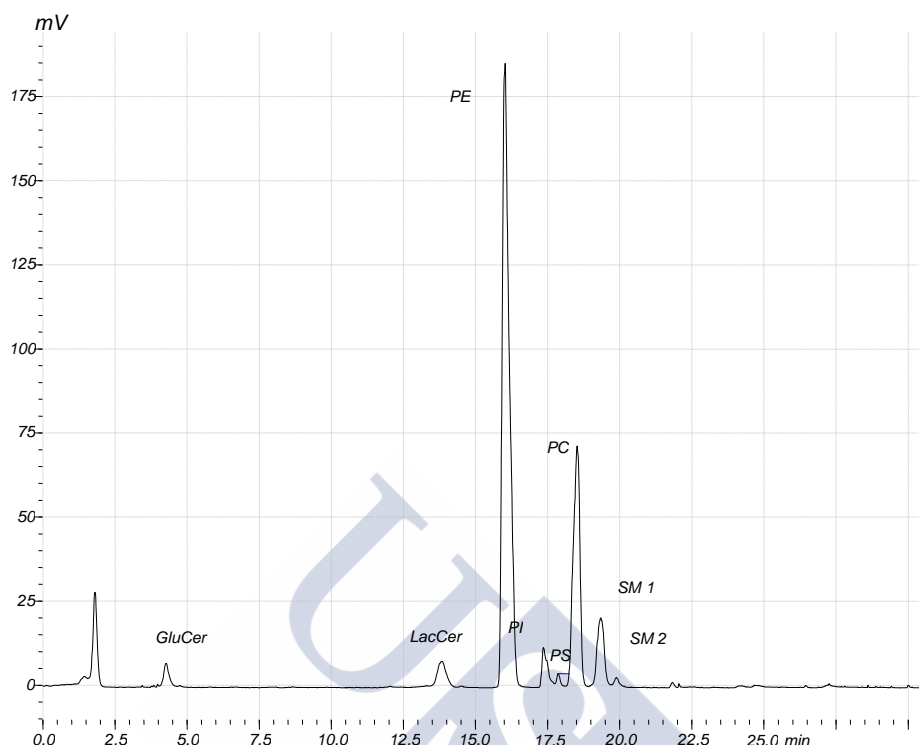


Figura 2.4. Cromatograma de una disolución multipatrón. Fases móviles: cloroformo:metanol:buffer (1 M ácido fórmico y trietilamina).

Se consiguió una separación satisfactoria de los compuestos, pero se observó que el uso prolongado de trietilamina, ocasiona oscilaciones importantes en la línea base y la aparición de picos fantasma a partir del minuto 15, impidiendo la cuantificación de los fosfolípidos. Según Fagan y Wijesundera (2004) otro inconveniente de los modificadores, trietilamina y ácido fórmico, es que causan un deterioro gradual de la forma del pico correspondiente a PS.

Se hicieron pruebas sin la utilización de buffer, solo con la mezcla cloroformo:metanol, y sustituyendo el buffer por agua (cloroformo:metanol:agua). En los dos casos no se logró la

separación de todos los picos, ya que la trietilamina y el ácido fórmico aumentan la respuesta del ELSD (Deschamps y col., 2001).

Se optó, entonces, por buscar una alternativa a la trietilamina. Antes de probar mezclas de fases móviles en gradiente, se hizo una prueba en isocrático con isopropanol, hexano y agua, según el método descrito por Salas y col. (2003), pero los resultados no fueron satisfactorios. Posteriormente, se probó con diferentes gradientes de cloroformo:metanol:amoníaco, fases móviles utilizadas también por otros autores para la separación de fosfolípidos (Becart y col., 1995; Avalli y Contarini, 2005); así se consigue separar PE, PI, PS, PC y SM; pero el empleo de amoníaco presenta un gran inconveniente, debido a que su pH básico disuelve la sílice y la duración de la columna se ve disminuida. Para solventar este problema, se adicionó ácido fórmico a la disolución de amoníaco con objeto de alcanzar un pH ácido. Se probaron diferentes mezclas de ácido fórmico y amoníaco, así como diferentes gradientes hasta optimizar las condiciones de separación para la identificación y cuantificación de los cinco principales fosfolípidos presentes en la leche y productos lácteos. Los detalles del método cromatográfico se describen en el apartado 2.3.5.3. de la sección “Material y Métodos”.

Como se observa en el cromatograma de la Figura 2.5. el orden de elución de PS se modifica al emplear los modificadores ácido fórmico y amoníaco, y en lugar de eluir entre PI y PC (Figura 2.4.), eluye en penúltimo lugar entre PC y SM.

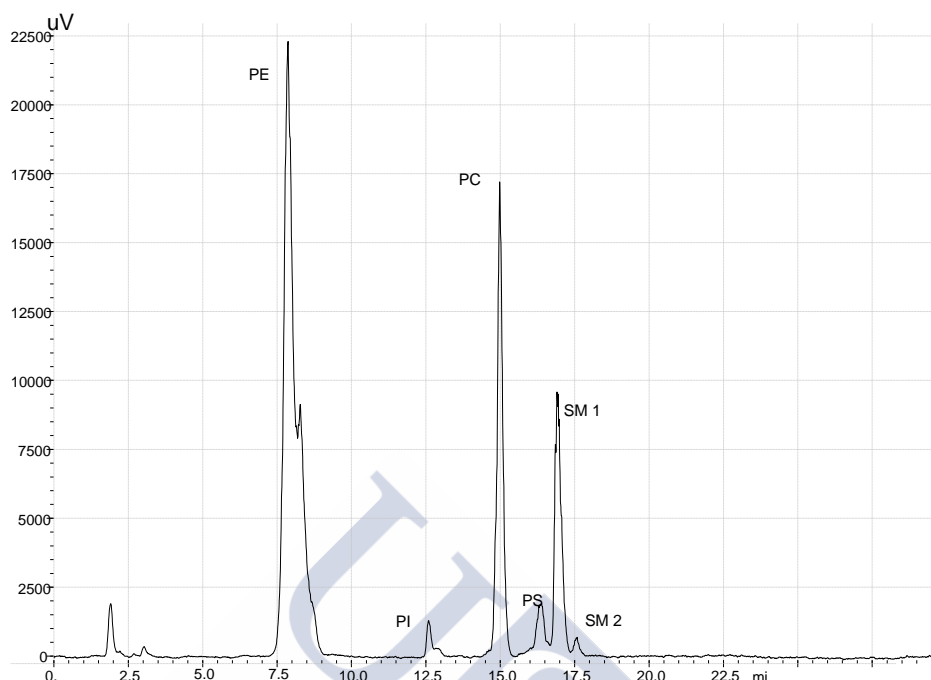


Figura 2.5 Cromatograma de una disolución multipatrón. Fases móviles: cloroformo:metanol:buffer (0,5% ácido fórmico y amoníaco).

La resolución de los picos fue 4,5 para PE-PI, 4,7 para PI-PC, 2,7 para PC-PS y 1,1 para PS-SM. En todos los casos, excepto entre los picos de PS y SM, la resolución es mayor de 1,5. Una resolución de 1,5 indica que la separación entre dos componentes es completa; mientras que con una resolución de 1,0 la proporción del área no separada es de aproximadamente un 4% (Skoog y col., 2003).

Cada pico corresponde a una clase de fosfolípido, compuesto a su vez por especies moleculares con diferentes ácidos grasos en sus moléculas. Esto puede explicar la aparición de picos con hombros y de dobles picos, que corresponderían a las especies moleculares. Para el caso concreto de la SM, cuando el patrón de SM de origen bovino se

analizó por separado del resto de fosfolípidos, se detectaron 3 subpicos, mientras que en combinación con el resto de fosfolípidos, se observó que la SM eluye como 2 subpicos (Figuras 2.4. y 2.5.). El doble o triple pico de la SM ha sido descrito en varios trabajos (Christie y col., 1987; Rombaut y col., 2006; López y col., 2008), siendo interpretado como la presencia o ausencia de un grupo hidroxilo extra o debido a las diferentes bases esfingoides y ácidos grasos.

En relación con las condiciones del detector de dispersión de luz, la ganancia se puede modificar del 1 al 12, siendo importante elegir una ganancia que no sature el detector. En cuanto a la presión de nitrógeno, se debe fijar un flujo óptimo de gas para que se produzca una relación señal-ruido adecuada. La temperatura de evaporación es otro factor muy importante; a más temperatura más ruido en la línea de fondo, pero se debe elegir una temperatura suficiente para que se evapore la fase móvil, evitando que se volatilice el analito. Se ensayaron distintas temperaturas (50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 80 °C) y se observó que el incremento de la temperatura disminuía la respuesta de SM; según Descalzo y col. (2003) esto podría ser debido a la evaporación de algunos ácidos grasos libres de bajo punto de ebullición. Los valores finalmente establecidos fueron: ganancia 3, presión de nitrógeno 3,5 bar y temperatura de evaporación 50 °C.

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas y los parámetros de detección, se llevó a cabo la validación del método.

2.4.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

La validación de un método analítico se puede definir como el proceso mediante el cual se demuestra que los resultados producidos por ese procedimiento son fiables y reproducibles, y que se ajustan al propósito para el que fue desarrollado (Kellner, 1998).

Existe una gran variedad de documentación acerca de la validación de los métodos analíticos y numerosas organizaciones promueven su difusión e importancia, como la AOAC, Environmental Protection Agency (EPA), Food and Drug Administration (FDA), International Conference on Harmonization (ICH), United States Pharmacopeia (USP), European Analytical Chemistry (EURACHEM), etc.

La validación de la metodología propuesta incluye ensayos de linealidad, límites de detección y cuantificación, precisión y exactitud.

2.4.2.1. LINEALIDAD

La linealidad de un procedimiento analítico se define como su capacidad (dentro de un intervalo) para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración o cantidad de analito en la muestra, o bien que se puedan calcular esas cantidades mediante ecuaciones matemáticas.

Para determinar la linealidad se tomó el área de los picos, de cada uno de los compuestos estudiados a 6 niveles de concentración, dentro del intervalo esperable, en muestras con

baja (leche natural), media (leche mazada) y alta (QFLM) concentración de fosfolípidos.

En la Tabla 2.3. se muestra el intervalo de concentración de cada patrón, la ecuación de regresión lineal del logaritmo de la cantidad inyectada frente al logaritmo del área, y los coeficientes de correlación al cuadrado (R^2) de cada compuesto. Se observó una linealidad aceptable obteniéndose en los intervalos de concentración indicados unos valores de R^2 comprendidos entre 0,975 y 0,993.

Tabla 2.3. Intervalos de concentración, ecuaciones y coeficientes de correlación al cuadrado de las rectas de calibrado.

PATRONES	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)	ECUACIONES	R^2
PE	50-1000	$y = 1,672x - 0,218$	0,992
PI	10-100	$y = 1,627x - 0,051$	0,975
PC	20-500	$y = 1,531x + 0,293$	0,986
PS	10-150	$y = 1,431x + 0,794$	0,993
SM	10-400	$y = 1,273x + 1,234$	0,987

Según las especificaciones técnicas del fabricante (Shimadzu, 2007), la respuesta del ELSD es exponencial y, aunque este hecho podría ser considerado inicialmente una desventaja, resulta fácil linealizar esta respuesta utilizando logaritmos para la el área y para la masa del analito. En las Figuras 2.6.-2.10. se representan gráficamente las rectas de calibrado.

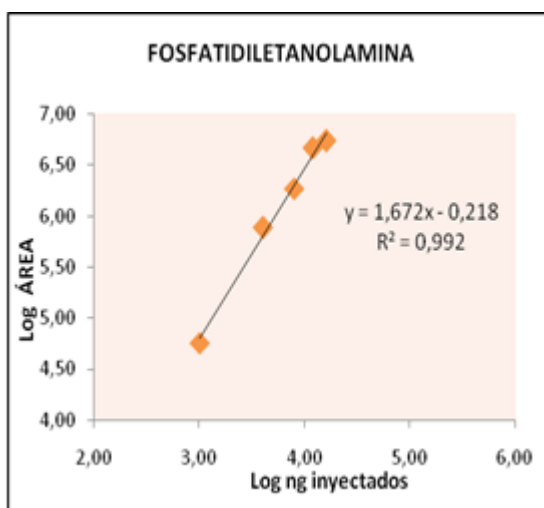


Figura 2.6. Recta de calibrado de PE.

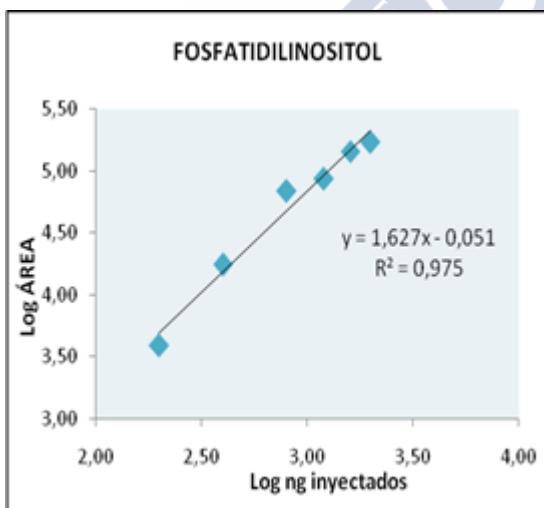


Figura 2.7. Recta de calibrado de PI.

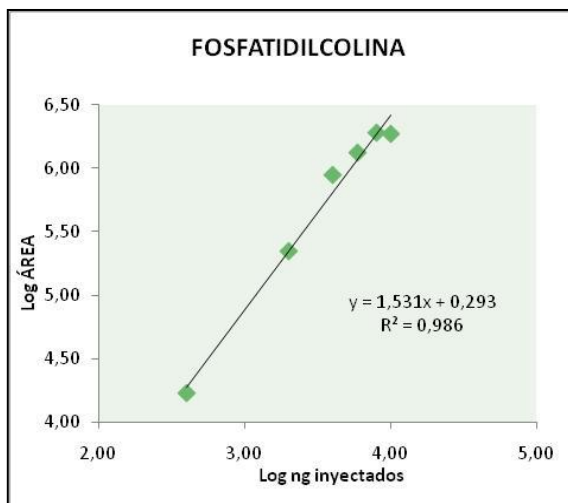


Figura 2.8. Recta de calibrado de PC.

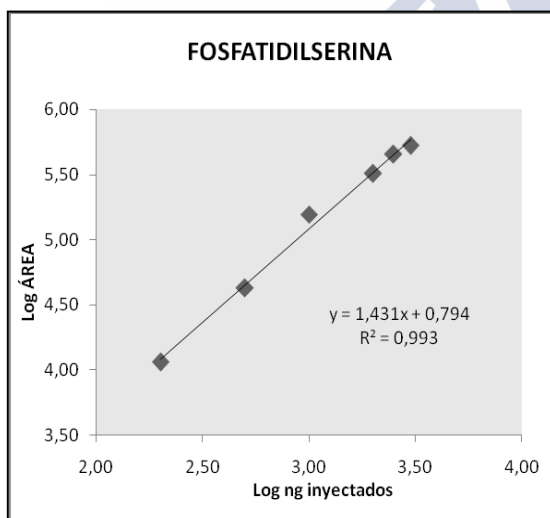


Figura 2.9. Recta de calibrado de PS.

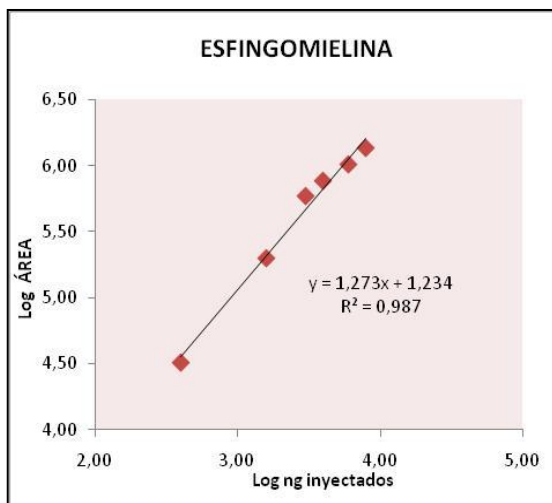


Figura 2.10. Recta de calibrado de SM.

A pesar de la respuesta exponencial del ELSD, algunos autores (Descalzo y col., 2003, Avalli y Contarini, 2005) han descrito respuestas lineales en función del intervalo de concentraciones, aunque en la mayoría de los casos, por debajo de 5 µg de analito inyectado, esta linealidad se pierde.

2.4.2.2. LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

El límite de detección (LDD) es la mínima concentración o cantidad de analito presente en la muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones experimentales establecidas. Por límite de cuantificación (LDC), se entiende, la mínima concentración o cantidad de analito en la muestra que puede ser determinada con aceptable exactitud y precisión, bajo dichas condiciones experimentales.

Existen diferentes formas de determinar los límites de detección y cuantificación:

- Basadas en una evaluación visual (métodos no instrumentales).
- Basadas en la relación señal/ruido (S/R).
- Basadas en la desviación estándar de la respuesta instrumental y la pendiente de la curva.

En este estudio, los límites de detección y cuantificación fueron determinados mediante la relación S/R. Este método, uno de los más conocidos y empleados, requiere que el procedimiento de análisis sea instrumental y que proporcione una señal blanco, un ruido de fondo o una línea de base, es decir una señal residual a concentración cero del analito tal como ocurre en los métodos cromatográficos.

Se suele definir el LDD como la concentración que origina una relación S/R, igual a un determinado valor, que generalmente es 3. Análogamente, el LDC corresponde a una relación S/R de 10. Así pues, en la práctica fue preciso medir la magnitud del ruido, multiplicar su valor por el factor elegido y convertirlo en una concentración mediante la recta de calibrado. Para estimar la magnitud del ruido se realizaron mediciones sobre la línea base de 8 cromatogramas obtenidos tras sucesivas inyecciones del blanco, midiéndose el área en el intervalo de tiempo de retención definido previamente para cada uno de los cinco fosfolípidos. El intervalo de tiempo de retención para cada compuesto se tomó del cromatograma de la disolución multipatrón más concentrada empleada en la recta de calibrado. Para la elaboración del blanco se hizo el proceso de

extracción sobre 20 mL de agua, sin la incorporación de muestra.

Los límites de detección encontrados oscilaron entre 0,17 y 0,61 μg inyectados en columna; y los límites de cuantificación entre 0,40 y 1,26 μg inyectados en columna. Estos valores entran dentro de los límites publicados en otros trabajos (Tabla 2.4.).

Tabla 2.4. Límites de detección y cuantificación.

Valores obtenidos en este estudio			Valores obtenidos por otros autores					
			Sala y col., (2003)		Rodríguez-Alcalá y Fontecha (2010)		Fagan y Wijesundera (2004)	Rombaut y col. (2005)
PL	LDD (μg)	LDC (μg)	LDD (μg)	LDC (μg)	LDD (μg)	LDC (μg)	LDD (μg)	LDD (μg)
PE	0,61	1,26	0,017	0,034	0,6	1,69	0,6	0,012
PI	0,26	0,53	0,057	0,108	0,3	0,91	0,7	0,014
PC	0,20	0,47	0,009	0,029	0,4	1,15	1,6	0,011
PS	0,17	0,40	0,076	0,164	0,3	0,97	--	0,018
SM	0,22	0,59	0,050	0,093	0,8	2,28	3	0,014

2.4.2.3. PRECISIÓN

La precisión es una medida del grado de separación o dispersión de las determinaciones realizadas mediante un método analítico. La precisión se puede evaluar a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

La repetibilidad indica el grado de dispersión de una serie de medidas realizadas varias veces consecutivas utilizando el mismo método y bajo las mismas condiciones (en el mismo laboratorio, por el mismo operador, usando el mismo equipo y en un corto periodo de tiempo).

La reproducibilidad indica el grado de dispersión entre los resultados de mediciones realizadas por el mismo método bajo distintas condiciones (en diferente laboratorio, por diferente operador y con diferente equipo).

En este estudio, debido a la disponibilidad de un solo equipo y analista, las pruebas de reproducibilidad no se pudieron efectuar y, en su defecto, se evaluó la precisión intermedia, que es una medida de la dispersión de los resultados obtenidos por un método analítico en un espacio de tiempo más amplio que la repetibilidad.

La precisión (repetibilidad y precisión intermedia), expresada como CV, se determinó tanto para el procedimiento completo como para el método cromatográfico.

2.4.2.3.1. Precisión del método cromatográfico

Repetibilidad: se realizaron 5 inyecciones de 3 tipos de muestras diferentes, cada muestra en una única sesión de trabajo. Los ensayos se hicieron con leche cruda (concentración baja), leche mazada cruda (concentración media) y QFLM (concentración alta), para ver la repetibilidad del método analítico a tres niveles de concentración diferentes.

Precisión intermedia: se analizaron las muestras de leche cruda, leche mazada cruda y QFLM empleadas en el ensayo de

repetibilidad, en 5 sesiones de trabajo a lo largo de un periodo de 15 días, inyectando cada una de ellas por duplicado ó triplicado.

El CV de la repetibilidad y de la precisión intermedia es inferior a 7,6 y 12,9% respectivamente, para las concentraciones de fosfolípidos presentes en las tres muestras (Tabla 2.5.). Los CV más altos corresponden, como se esperaba, a la muestra de leche cruda (muestra con la menor concentración de fosfolípidos) y para los ensayos inter-día.

En un estudio de Rodríguez-Alcalá y Fontecha (2010), los CV de PE, PI, PC, PS y SM tanto de los ensayos intra-día como en los inter-día, son muy bajos, situándose los valores máximos y mínimos en 0,24 y 1,78% respectivamente. En otros métodos de separación de fosfolípidos con mezclas de solventes distintos a cloroformo:metanol, los CV presentan valores que se aproximan más a los obtenidos en nuestros ensayos. Por ejemplo, en el estudio de Homan y Anderson (1998), los datos expresados en CV para el ensayo de repetibilidad oscilan entre 4,0 y 10,2%.

Tabla 2.5. Repetibilidad y precisión intermedia del método cromatográfico.

PL	REPETIBILIDAD			PRECISIÓN INTERMEDIA		
	CV (%)			CV (%)		
	Leche cruda	Leche mazada cruda	QFLM	Leche cruda	Leche mazada cruda	QFLM
PE	1,6	1,7	2,3	3,6	1,8	6,2
PI	6,9	2,9	4,2	10,5	7,1	3,0
PC	4,3	3,4	5,6	12,9	7,7	8,8
PS	7,6	4,8	2,8	4,7	5,0	6,3
SM	6,9	3,3	5,7	12,3	10,5	2,5

2.4.2.3.2. Precisión del procedimiento completo.

Repetibilidad: se realizaron 5 extracciones de la misma muestra de leche cruda, inyectando cada una por duplicado en la misma sesión de trabajo.

Precisión intermedia: se realizaron 5 extracciones de una muestra de leche cruda, en 5 sesiones de trabajo diferentes, a lo largo de un periodo de un mes, inyectando cada una de ellas por duplicado ó triplicado.

Los valores de la precisión (Tabla 2.6.), medidos como CV, son inferiores al 10%, salvo para PI en el ensayo de la repetibilidad, donde el CV es del 12,4% y no se observa una tendencia a CVs mayores para la precisión intermedia. Esto indica que las variaciones son bastantes constantes independientemente de si

la extracción de una muestra se realiza el mismo día o en días sucesivos.

En la bibliografía, se han encontrado datos comparativos con respecto a la repetibilidad del proceso extractivo; Avalli y Contarini (2005), en un ensayo de 4 repeticiones de la extracción, consiguieron unos CV que varían entre 1,1 y 8,1%. En Descalzo y col., (2003), los CV oscilaron entre 0,6 y 9,6%, para 5 extracciones inyectadas en días diferentes. En cualquier caso, se consideran bastante satisfactorios los resultados obtenidos en este trabajo, teniendo en cuenta que se trata de determinar componentes minoritarios presentes en la grasa de la leche, mediante una técnica analítica que incorpora un paso previo de extracción y un posterior análisis en columna en fase normal, habiéndose descrito (Vázquez y col., 2007) cierta falta de reproducibilidad en análisis efectuados con columnas de sílice.

Tabla 2.6. Repetibilidad y precisión intermedia del proceso de extracción.

FOSFOLÍPIDOS	REPETIBILIDAD CV (%)	PRECISIÓN INTERMEDIA CV (%)
PE	5,7	7,1
PI	12,4	7,7
PC	7,0	7,0
PS	8,2	8,7
SM	9,6	5,6

2.4.2.4. EXACTITUD

La exactitud indica la cercanía de los datos obtenidos a un valor considerado como verdadero, que es el valor de referencia. Existen varios procedimientos para determinar la exactitud de una metodología analítica:

- Método que usa una referencia externa: aplicación del procedimiento analítico a materiales de referencia certificados, cuya concentración de analito es conocida y comparación del valor medido con el valor certificado como real.
- Método de las adiciones, en el que se añade un estándar que es el valor de referencia.

En este estudio, se optó por el método de las adiciones y se calculó la exactitud en una muestra de leche cruda adicionada con una disolución multipatrón. La muestra sin adicionar fue inyectada previamente para conocer la concentración inicial. El ensayo se hizo por duplicado, inyectando cada muestra adicionada por cuadruplicado. Las recuperaciones se calcularon aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Recuperación} = (C_{\text{final}} - C_{\text{muestra}}) / C_{\text{añadida}} \times 100$$

Donde C_{final} es la concentración en la muestra adicionada con el patrón, C_{muestra} es la concentración en la muestra antes de adicionar y $C_{\text{añadida}}$ es la cantidad conocida de estándar añadido. En la Tabla 2.7. se presentan los datos de recuperación que se obtuvieron para cada uno de los estándares presentes en la disolución multipatrón. Los valores obtenidos fueron satisfactorios, siendo las recuperaciones para PS y SM las más bajas, con unos porcentajes del 72 y 83%, respectivamente.

Valores parecidos han sido publicados por otros autores, con recuperaciones que oscilan entre 80,6 - 99,8 (Bünger y Pison, 1995) y 90,25-107,8 (Salas y col., 2003).

Tabla 2.7. Valores de los ensayos de exactitud.

COMPUESTO	% RECUPERACIÓN \pm SD
PE	111 \pm 2,42
PI	110 \pm 11,82
PC	112 \pm 2,88
PS	72 \pm 11,77
SM	83 \pm 2,62

2.5. BIBLIOGRAFÍA

Avalli, A., Contarini, G. (2005). Determination of phospholipids in dairy products by SPE/HPLC/ELSD. *Journal of Chromatography A*. 1071: 185-190.

Becart, J., Chevalier, C., Biesse, J.P. (1990). Quantitative analysis of phospholipids by HPLC with a light scattering evaporating detector-Application to raw materials for cosmetic use. *Journal of High Resolution Chromatography*. 13: 126-129.

Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37: 911-917.

Bünger, H., Pison, U. (1995). Quantitative analysis of pulmonary surfactant phospholipids by high-performance liquid chromatography and light-scattering detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 672(1): 25-31.

Carunchio, V., Nicoletti, I., Frezza, L., Sinibaldi, M. (1984). High-performance liquid chromatography of phospholipids on chemically bonded silica gel. *Annali di Chimica*. 74: 331-339.

Castro-Gómez, M.P., Rodríguez-Alcalá, L.M., Calvo, M. V. Romero, J., Mendiola, J.A., Ibañez, E., Fontecha, J. (2014). Total milk fat extraction and quantification of polar and neutral lipids of cow, goat, and ewe milk by using a pressurized liquid system and chromatographic techniques. *Journal of Dairy Science*. 97:6719-6728.

Chirstie W.W. (1986). Separation of lipid classes by high-performance liquid chromatography with the mass detector. *Journal of Chromatography*. 361: 396-399.

Christie, W.W., Nobel, R.C., Davies, G. (1987). Phospholipids in milk and dairy products. *Journal of Dairy Technology*. 40: 10-12.

Descalhmps, F.S., Gaudin, K., Lesellier, E., Tchaplá A., Ferrier, D., Baillet, A., Chaminade, P. (2001). Response enhancement for the evaporative light scattering detection for the analisis of lipid classes and molecular species. *Chromatographia*. 54, nº9-10.

Descalzo, A.M., Insani, E.M, Pensel, N.A. (2003). Light-scattering detection of phospholipids resolved by HPLC. *Lipids*. 38(9): 999-1003.

Fagan, P., Wijesundera, C. (2004). Liquid chromatographic analysis of milk phospholipids with on-line pre-concentration. *Journal of Chromatography A*. 1054: 241-249.

FIL- IDF (2000). International Standard 141C. Whole milk. Determination of milkfat, protein and lactose content. Guidance

on the operation of mid-infrared instruments. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

FIL- IDF (2008). International Standard 222. Cheese. Determination of fat content. Van Gulik method. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

Folch, J., Lees, M., Stanley, H.S. (1956). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 226: 497-509.

Hara, A., Radin, N.S. (1978). Lipid extraction of tissues with a low toxicity solvent. *Analytical Biochemistry*. 90: 420-426.

Hatzakis, E., Koidis, A., Boskou, D., Dais, P. (2008). Determination of phospholipids in olive oil by ³¹P NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(15): 6232-6240.

Heitmann, D., Lissel, M., Kempken, R., Muthing, J. (1996). Replacement of chloroform throughout glycosphingolipid isolation. *Biomedical Chromatography*. 10: 245-250.

Homan, R., Anderson, M.K. (1998). Rapid separation and quantitation of combined neutral and polar lipid classes by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering mass detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 708 (1-2): 21-26.

Hvattum, E., Uran, S., Sandbæk, A.G., Karlson, A.Å., Skotland, T. (2006). Quantification of phosphatidylserine, phosphatidic acid and free fatty acids in an ultrasound contrast agent by normal-phase high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 42(4): 506-512.

Kellner, R.A, Mermet, J., Otto, M., Widmer, H. (1998). Analytical Chemistry: the approved text to the FECS curriculum analytical chemistry. Wiley-VCH.

Lopez, C., Briard-Bion, V., Menard, O., Rousseau, F., Pradel, P., Besle, J. M. (2008). Phospholipid, sphingolipid, and fatty acid compositions of the milk fat globule membrane are modified by diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(13): 5226-5236.

Nollet, L.M.L. (1992). Food analysis by HPLC. New York: Marcel Dekker, Inc.

Pang, L., Liang, Q., Wang, Y., Ping, L., Luo, G. (2008). Simultaneous determination and quantification of seven major phospholipid classes in human blood using normal-phase liquid chromatography coupled with electrospray mass spectrometry and the application in diabetes nephropathy. *Journal of Chromatography B*. 869(1-2): 118-125.

Pulfer, M., Murphy, R.C. (2003). Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrometry Reviews*. 22(5): 332-364.

Rodríguez-Alcalá, L.M., Fontecha, J. (2010). Major lipid classes separation of buttermilk, and cows, goats and ewes milk by high performance liquid chromatography with an evaporative light scattering detector focused on the phospholipid fraction. *Journal of Chromatography A*. 1217 (18): 3063-3066.

Rombaut, R., Camp, J.V., Dewettinck, K. (2005). Analysis of phospho- and sphingolipids in dairy products by a new HPLC method. *Journal of Dairy Science*. 88: 482-488.

Rombaut, R., Camp, J.V., Dewettinck, K. (2006). Phospho- and sphingolipid distribution during processing of milk, butter and whey. *International Journal of Food Science and Technology*. 41(4): 435-443.

Rombaut, R., Dewettinck, K. (2006). Properties, analysis and purification of milk polar lipids. *International Dairy Journal*. 16:1362-1373.

Rombaut, R., Dewettinck, K., Camp, J.V. (2007). Phospho- and sphingolipid content of selected dairy products as determined by HPLC coupled to an evaporative light scattering detector (HPLC-ELSD). *Journal of Food Composition and Analysis*. 20:308-312.

Sala Vila, A., Castellote-Bargalló, A.I., Rodríguez-Palmero-Seuma, M., López Sabater, M.C. (2003). High-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection for the determination of phospholipids classes in human milk, infant formulas and phospholipid sources of long-chain polyunsaturated fatty acids. *Journal of Chromatography A*. 1008(1): 73-80.

Samet, J.M, Friedman, M., Henke, D.C. (1989). High-performance liquid chromatography separation of phospholipid classes and arachidonic acid on cyanopropyl columns. *Analytical Biochemistry*. 182(1): 32-36.

Shaikh, N.A. (1994). Assessment of various techniques for the quantitative extraction of lysophospholipids from myocardial tissues. *Analytical Biochemistry*. 216: 313-321.

Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A. (2003). *Principios de Análisis Instrumental*. (5th ed.). Madrid: McGraw-Hill, D.L.

Theodet, C., Gandemer, G. (1991). Comparison of 5 methods for lipid extraction from whey and its by-products. *Lait* 71: 41-54.

Uran, S., Larsen, Å., Jacobsen, P.B., Skotland, T. (2001). Analysis of phospholipid species in human blood using normal-phase liquid chromatography coupled with electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 758(2): 265-275.

Vaghela, M.N., Kilara, A. (1995). Quantitative analysis of phospholipids from whey protein concentrates by high-performance liquid chromatography with a narrow-bore column and an evaporative light-scattering detector. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 72,nº6

Vázquez, L., Toré, A., Torres, C.F., Señoráns, F.J., Reglero, G. (2007). Detector evaporativo de dispersión de luz. Una herramienta versátil en el análisis de aceites y grasas. *Alimentaria*. 385: 62-65.

Wang, C., Xie, S., Yang, J., Yang, Q., Xu, G. (2004). Structural identification of human blood phospholipids using liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 525(1): 1-10.





3. FOSFOLÍPIDOS EN LECHE DE PRODUCCIÓN ECOLÓGICA Y EN LECHE CONVENCIONAL



3.1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha producido un aumento en la demanda de los llamados alimentos ecológicos; la industria láctea no ha sido ajena a esta demanda y se ha visto incrementado tanto el consumo de leche como el de otros productos lácteos de origen ecológico.

Según algunos estudios la leche producida por vacas criadas de forma ecológica contiene mayor proporción de ácidos grasos insaturados, vitaminas y antioxidantes que la leche convencional (Bergamo y col., 2003; Ellis y col., 2006).

Según el Reglamento 834/2007 de la Unión Europea (DOUE, 2007) la producción ecológica es un sistema general de gestión agrícola y de producción de alimentos, que combina las mejores prácticas ambientales, un elevado nivel de biodiversidad, la preservación de los recursos naturales, la aplicación de normas exigentes sobre bienestar animal y la producción conforme a las preferencias de determinados consumidores por productos obtenidos a partir de sustancias y procesos naturales.

Para que un alimento pueda ser considerado “ecológico” debe cumplir una serie de requisitos que, en el caso de la leche, abarcan desde el cuidado y alimentación de las vacas hasta el etiquetado del producto final.

Algunos de los requisitos relacionados con la producción son (DOUE, 2007):

El ganado tendrá acceso permanente a pastos o forrajes.

El ganado en fase de cría deberá alimentarse con leche natural, preferiblemente materna.

La alimentación del ganado ha de ser con pienso ecológico, compuesto de ingredientes procedentes de la agricultura ecológica.

Se aplicarán prácticas ganaderas que mejoren el sistema inmunitario y refuercen las defensas naturales contra las enfermedades, con inclusión de ejercicio regular y acceso a zonas al aire libre y a pastos. Las Figuras 3.1. y 3.2. muestran vacas de producción ecológica e intensiva, respectivamente.



Figura 3.1. Vacas lecheras en producción ecológica.

El número de animales será limitado con objeto de minimizar el sobrepastoreo, el deterioro, la erosión y la

contaminación del suelo causada por los animales o el esparcimiento de sus excrementos.



Figura 3.2. Vacas lecheras en producción intensiva.

Está prohibida la utilización de productos modificados genéticamente.

El ganado ecológico se mantendrá separado de otros tipos de ganado. Sin embargo, se permitirá que animales criados ecológicamente pastoreen en tierras comunales y que animales criados de forma no ecológica lo hagan en tierras de producción ecológica, con arreglo a determinadas condiciones restrictivas.

El atado o aislamiento de los animales por norma general está prohibido.

Se reducirá al mínimo el sufrimiento durante toda la vida de los animales.

Los terneros deberán estar en habitáculos individuales hasta los siete días de vida. Estos habitáculos estarán contruidos de tal forma que cada ternero pueda ver y oír a otros terneros, levantarse, acostarse y girarse a su alrededor sin dificultad.

Cuando un tipo de leche cumple con todos los requisitos exigidos se le reconoce con un logotipo de producción ecológica de la Unión Europea, que desde el 1 de julio de 2010 es el que se muestra en la Figura 3.3.



Figura 3.3. Logotipo de los alimentos de producción ecológica de la Unión Europea.

3.2. OBJETIVO

En la bibliografía revisada no hemos encontrado ningún estudio del contenido en fosfolípidos de la leche de producción ecológica, por lo que nos hemos planteado en este trabajo llenar

ese vacío y comparar, en ese aspecto, la leche de producción ecológica con la de producción convencional.

El objetivo de este estudio es determinar y comparar el contenido de fosfolípidos totales y de los principales fosfolípidos (PE, PI, PC, PS y SM) en la leche de vaca de producción ecológica y convencional.

3.3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.3.1. MUESTRAS

Se analizaron un total de 16 pares de muestras de leche de vaca, que fueron recogidas y suministradas entre los meses de marzo de 2010 y enero de 2012 por Leche de Galicia S.L.

Cada par de muestras incluye una muestra de leche de producción ecológica y una muestra de leche de producción convencional, tomadas las dos en el mismo día.

Las muestras de ambos tipos de leche se cogieron después de la descarga de la leche, procedente de granjas del noroeste de España (Galicia y Asturias), en los tanques de la empresa de aproximadamente 40.000 L de capacidad en el caso de la leche ecológica y de aproximadamente 100.000 L de capacidad en el caso de la leche convencional. Pueden, por lo tanto, ser consideradas muestras representativas para la estimación de los valores medios de la zona de recogida. En el caso de la leche ecológica, los 40.000 L representan la totalidad de la producción de la zona (20.000 L diarios), con recogida cada dos días.

Las muestras se recibieron refrigeradas y, en los casos en que fue necesario, se congelaron hasta la extracción de los fosfolípidos.

3.3.2. ANÁLISIS DE LA GRASA

La determinación de la materia grasa se lleva a cabo por espectroscopía infrarroja, mediante un Milkoscan FT2 (Foss Electric LTDA, Dinamarca) según la norma FIL-IDF 141C (2000). La muestra se calienta a 40 °C antes de introducirla en el analizador.

3.3.3. DETERMINACIÓN DE LOS FOSFOLÍPIDOS

Esta determinación se hace en dos etapas:

En primer lugar se lleva a cabo la extracción, para ello se pesan 10 g de muestra y se sigue el procedimiento descrito en la sección 2.3.3.3.

Una vez completada la extracción se hace la determinación cromatográfica, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 2.3.5.3.

3.3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La media aritmética, desviación típica (DS) y la prueba “t” de comparación entre pares con dos colas fueron determinadas con el programa Microsoft Excel 2003.

3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las Tablas 3.1. y 3.2. muestran los valores obtenidos para los distintos fosfolípidos, expresados como mg por kg de leche, en la leche ecológica y convencional respectivamente.

Tabla 3.1. Contenido de fosfolípidos en mg/kg de leche en muestras de leche ecológica.

Fecha recogida	PL	PE	PI	PC	PS	SM
09/03/10	260,9	114,7	18,5	62,9	18,5	46,3
23/03/10	301,3	132,5	18,2	69,0	23,6	58,1
11/06/10	324,9	135,1	18,8	78,7	22,2	70,1
29/06/10	296,4	123,2	13,3	66,6	21,7	71,6
13/07/10	250,3	113,8	12,3	57,8	17,5	49,0
06/08/10	250,2	115,2	10,8	61,2	16,2	46,8
07/09/10	340,4	141,7	20,2	82,8	23,9	71,8
27/01/11	352,5	142,8	20,4	83,5	24,1	81,6
11/05/11	337,6	127,3	20,8	88,7	40,4	60,5
12/07/11	345,2	128,8	22,2	89,9	38,9	65,5
05/08/11	338,2	124,6	21,7	77,5	39,9	74,5
14/09/11	432,8	150,8	28,8	107,6	58,8	86,8
22/09/11	370,9	135,3	25,0	89,7	46,4	74,5
18/10/11	395,5	147,4	24,2	99,8	49,1	74,9
09/11/11	387,4	142,2	23,8	94,5	46,9	80,0
12/01/12	381,4	130,7	25,0	97,0	46,7	82,0
Media n=16	335,4	131,6	20,2	81,7	33,4	68,4
DS	53,2	11,6	4,9	14,9	13,8	12,9

Tabla 3.2. Contenido de fosfolípidos en mg/kg de leche en muestras de leche convencional.

Fecha recogida	PL	PE	PI	PC	PS	SM
09/03/10	247,2	116,6	16,1	58,3	16,1	40,2
23/03/10	286,6	119,4	17,9	69,7	21,9	57,7
11/06/10	252,8	112,6	12,9	66,4	14,8	46,1
29/06/10	308,4	135,1	14,6	69,4	18,3	71,2
13/07/10	291,6	131,4	12,6	70,2	19,8	57,6
06/08/10	246,2	102,6	11,2	59,7	18,7	54,1
07/09/10	283,9	114,7	16,9	71,4	18,8	62,0
27/01/11	254,9	81,2	12,2	56,0	15,0	90,6
11/05/11	373,3	131,1	24,2	92,6	45,6	79,9
12/07/11	303,6	117,9	16,0	75,4	38,1	56,3
05/08/11	335,9	125,0	20,9	83,6	38,4	68,0
14/09/11	381,8	127,8	25,3	100,6	48,0	80,1
22/09/11	345,5	127,8	23,9	86,1	40,9	66,8
18/10/11	349,7	131,4	21,8	88,5	44,6	63,5
09/11/11	345,4	132,2	23,0	85,0	41,1	64,1
12/01/12	344,7	122,9	21,6	86,7	41,9	71,6
Media n=16	309,5	120,6	18,2	76,2	30,1	64,4
DS	45,5	13,7	4,8	13,2	12,9	12,9

Las Tablas 3.3. y 3.4. muestran los valores de los mismos componentes expresados como porcentaje sobre materia grasa,

también para la leche ecológica y convencional respectivamente.

Tabla 3.3. Contenido de fosfolípidos en porcentaje sobre materia grasa en muestras de leche ecológica.

Fecha recogida	Grasa % (m/m)	PL	PE	PI	PC	PS	SM
09/03/10	3,70	0,705	0,310	0,050	0,170	0,050	0,125
23/03/10	3,63	0,830	0,365	0,050	0,190	0,065	0,160
11/06/10	3,42	0,950	0,395	0,055	0,230	0,065	0,205
29/06/10	3,33	0,890	0,370	0,040	0,200	0,065	0,215
13/07/10	3,50	0,715	0,325	0,035	0,165	0,050	0,140
06/08/10	3,60	0,695	0,320	0,030	0,170	0,045	0,130
07/09/10	3,68	0,925	0,385	0,055	0,225	0,065	0,195
27/01/11	3,71	0,950	0,385	0,055	0,225	0,065	0,220
11/05/11	3,76	0,910	0,343	0,056	0,239	0,109	0,163
12/07/11	3,70	0,933	0,348	0,060	0,243	0,105	0,177
05/08/11	3,80	0,890	0,328	0,057	0,204	0,105	0,196
14/09/11	3,79	1,142	0,398	0,076	0,284	0,155	0,229
22/09/11	3,90	0,951	0,347	0,064	0,230	0,119	0,191
18/10/11	3,93	1,014	0,378	0,062	0,256	0,126	0,192
09/11/11	4,04	0,959	0,352	0,059	0,234	0,116	0,198
12/01/12	3,96	0,963	0,330	0,063	0,245	0,118	0,207
Media n=16	3,72	0,901	0,355	0,054	0,219	0,089	0,184
DS	0,19	0,118	0,028	0,011	0,034	0,034	0,032

Tabla 3.4. Contenido de fosfolípidos en porcentaje sobre materia grasa en muestras de leche convencional.

Fecha recogida	Grasa % (m/m)	PL	PE	PI	PC	PS	SM
09/03/10	4,02	0,615	0,290	0,040	0,145	0,040	0,100
23/03/10	3,98	0,720	0,300	0,045	0,175	0,055	0,145
11/06/10	3,69	0,685	0,305	0,035	0,180	0,040	0,125
29/06/10	3,65	0,845	0,370	0,040	0,190	0,050	0,195
13/07/10	3,60	0,810	0,365	0,035	0,195	0,055	0,160
06/08/10	3,73	0,660	0,275	0,030	0,160	0,050	0,145
07/09/10	3,76	0,755	0,305	0,045	0,190	0,050	0,165
27/01/11	3,94	0,647	0,206	0,031	0,142	0,038	0,230
11/05/11	3,76	0,993	0,349	0,064	0,246	0,121	0,213
12/07/11	3,73	0,814	0,316	0,043	0,202	0,102	0,151
05/08/11	3,80	0,884	0,329	0,055	0,220	0,101	0,179
14/09/11	3,78	1,010	0,338	0,067	0,266	0,127	0,212
22/09/11	3,86	0,895	0,331	0,062	0,223	0,106	0,173
18/10/11	3,97	0,882	0,331	0,056	0,223	0,112	0,160
09/11/11	4,03	0,857	0,328	0,057	0,211	0,102	0,159
12/01/12	4,07	0,847	0,302	0,053	0,213	0,103	0,176
Media n=16	3,84	0,807	0,315	0,047	0,199	0,078	0,168
DS	0,15	0,112	0,039	0,012	0,034	0,033	0,033

La suma de las concentraciones de PE, PI, PC, PS y SM fue considerada como la concentración total de fosfolípidos (PL).

El contenido medio es, en todos los fosfolípidos, mayor en la leche ecológica que en la convencional, tanto en mg por kg de leche como en porcentaje de grasa. Cuando se contrastan los valores obtenidos, expresados en porcentaje de materia grasa, se observa que la diferencia, en favor de la leche de producción ecológica, fue bastante uniforme para todos los fosfolípidos, un 12,7% para PE, un 14,9% para PI, un 10,1% para PC, un 14,1% para PS, un 9,5% para SM y un 11,6% para el total de los fosfolípidos.

Cuando se aplicó el test “t” de comparación entre pares con dos colas, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) para todos los fosfolípidos (PE, PI, PC, PS y SM) y para la suma total de fosfolípidos, cuando se expresan en porcentaje de grasa.

Teniendo en cuenta que la alimentación es uno de los factores que más influyen en el contenido de fosfolípidos en la leche (Lopez y col., 2008; Lopez y col., 2014), en nuestra opinión, las diferencias en el contenido de fosfolípidos entre los dos sistemas de producción se explican, fundamentalmente, por este factor. Puesto que las diferencias entre las granjas de producción convencional y ecológica que suministraron la leche para la realización de este estudio son importantes y radican, fundamentalmente, en tres aspectos:

1º Las granjas de producción ecológica son extensivas y la alimentación se basa principalmente en el pasto, frente a la producción intensiva en la granjas convencionales. Esto conduce, asimismo, a que los animales hagan más ejercicio físico en las granjas ecológicas.

2º El consumo de pienso es menor en las granjas de producción ecológica, aproximadamente 4 kg por vaca y día, mientras que en las granjas de producción convencional se alcanza una media de aproximadamente 10 kg por vaca y día.

3º El maíz forrajero es un producto muy utilizado en las granjas de producción convencional; mientras que apenas se utiliza en las granjas de producción ecológica, debido a la necesidad de aplicar herbicidas para controlar el crecimiento de malas hierbas.

En un estudio llevado a cabo recientemente en la Bretaña francesa con leche de vaca, aunque no de producción ecológica, los resultados obtenidos por Lopez y col. (2014), concuerdan con los del presente estudio. Estos autores encontraron un mayor contenido de fosfolípidos en la leche producida en primavera, con una alimentación a base de pasto fresco, en relación con la de producción invernal, con una alimentación basada en ensilados de maíz; no habiendo cambiado el perfil de fosfolípidos entre las dos estaciones.

Al revisar estudios de otros autores, se observa que tanto la concentración de fosfolípidos totales, como el porcentaje de las distintas especies de fosfolípidos es muy variable para leche de vaca (Christie y col., 1987; Bitman y Wood, 1990; Fagan y Wijesundera, 2004; Avalli y Contarini, 2005; Rombaut y col., 2005; Rombaut y col., 2006; Lopez y col., 2008; Ménard y col., 2010; Rodríguez-Alcalá y Fontecha, 2010; Donato y col., 2011, Lopez y col., 2011; López y col., 2014). Estos valores oscilan entre 44,9 y 420,8 mg de fosfolípidos totales por kg de leche o entre 0,25 y 1,11 g por 100 g de grasa (Tabla 3.5.). Sorprende la

amplitud de este intervalo, en el que los valores máximos son más de ocho veces mayores que los mínimos cuando la concentración de fosfolípidos se expresa sobre leche y más de cuatro veces mayores cuando se expresa sobre materia grasa. Destacan especialmente, en este sentido, los valores extremadamente bajos recogidos en el estudio de Donato y col. (2011) en leche pasteurizada, que muestran una desviación importante con respecto a los encontrados en nuestro estudio y también con los obtenidos por los demás autores. Hay que señalar, que en el proceso de pasteurización puede disminuir algo el contenido de fosfolípidos (Corredig y Dalglish, 1998), pero al tratarse de un tratamiento térmico suave no justificaría por sí mismo una diferencia tan grande.

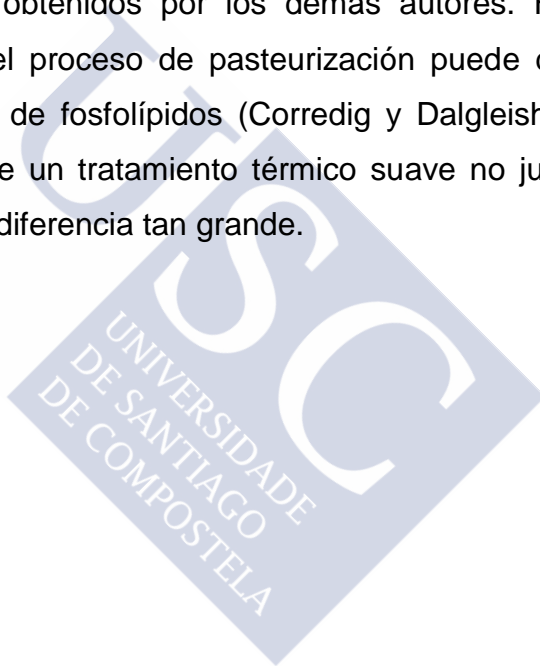


Tabla 3.5. Contenido y perfil de fosfolípidos en leche de vaca en otros estudios.

Referencia	mg/kg leche	g/100g grasa	%PE	%PI	%PC	%PS	%SM
Christie y col. (1987)	212		37,1	6,7	27,5	3,0	25,6
Bitman y Wood (1990)	175-420,8	0,56-1,11	19,8-31,1	4,1-11,8	25,1-35,1	1,9-8,5	28,7-34,1
Fagan y Wijesundera (2004)	242		38,6		32,2		29,2
Avalli y Contarini (2005)	93,6	0,36	32,3	9,3	27,3	10,5	20,5
Rombaut y col. (2005)*	263	0,64	46,3	5,3	21,1	7,4	19,8
Rombaut y col. (2006)	380	0,93	33,1	5,2	27,4	9,3	25,0
Lopez y col. (2008)		0,25-0,30	26,8	13,6-12,7	22,0-21,0	16,1	23,4-21,6
Ménard y col. (2010)		0,36	29,1	10,4	21,8	11,8	26,9
Rodríguez-Alcalá y Fontecha (2010)*		0,36	38,6	6,5	26,0	7,7	21,3
Donato y col. (2011)	44,9		72,2	1,4	8,0	11,6	7,0
Lopez y col. (2011)		0,63	23,2	8,1	26,6	16,1	26,0
Lopez y col. (2014) en invierno	112	0,27	28	11,5	22,5	16	22
Lopez y col. (2014) en primavera	138	0,35	29,5	10,5	22	15	23

Además de la alimentación (Lopez y col., 2008), otros factores pueden ocasionar diferencias en el contenido de fosfolípidos en la leche, como la fase de lactación (Bitman y Wood, 1990), el procesado (Gallier y col., 2010), la estación del

año, la edad del animal o, incluso, el método de análisis (Rombaut y Dewettink, 2006).

Las medias de los valores hallados en nuestro estudio, tanto para leche de producción ecológica (Tablas 3.1. y 3.3.) como convencional (Tablas 3.2. y 3.4.), están en la franja alta de los valores bibliográficos antes citados (Tabla 3.5.); superan en más del doble a los valores obtenidos por Avalli y Contarini (2005), Lopez y col. (2008), Rodríguez-Alcala y Fontecha (2010), Ménard y col. (2010), Donato y col. (2011) y Lopez y col. (2014); son algo más elevados que los obtenidos por Christie y col. (1987), Fagan y Wijesundera (2004), Rombaut y col. (2005) y Lopez y col. (2011); se encuentran dentro del intervalo de los valores obtenidos por Bitman y Wood (1990) y solo son un poco más bajos que los obtenidos por Rombaut y col. (2006).

A pesar de las diferencia en los valores absolutos, el contenido relativo de los fosfolípidos es muy similar en la leche ecológica y convencional; puesto que el porcentaje de aumento que se produce en la leche ecológica es muy parecido para los cinco fosfolípidos analizados. Las Tablas 3.6. y 3.7. muestran la composición relativa de los fosfolípidos en la leche de producción ecológica y convencional respectivamente.

Tabla 3.6. Contenido relativo de fosfolípidos en muestras de leche ecológica.

Fecha recogida	PE	PI	PC	PS	SM
09/03/10	43,97	7,09	24,11	7,09	17,73
23/03/10	43,98	6,02	22,89	7,83	19,28
11/06/10	41,58	5,79	24,21	6,84	21,58
29/06/10	41,57	4,49	22,47	7,30	24,16
13/07/10	45,45	4,90	23,08	6,99	19,58
06/08/10	46,04	4,32	24,46	6,47	18,71
07/09/10	41,62	5,95	24,32	7,02	21,08
27/01/11	40,53	5,79	23,68	6,84	23,16
11/05/11	37,69	6,15	26,26	11,97	17,91
12/07/11	37,30	6,43	26,04	11,25	18,97
05/08/11	36,85	6,40	22,92	11,80	22,02
14/09/11	34,85	6,65	24,87	13,57	20,05
22/09/11	36,49	6,73	24,19	12,51	20,08
18/10/11	37,28	6,11	25,25	12,42	18,93
09/11/11	36,70	6,15	24,40	12,10	20,65
12/01/12	34,27	6,54	25,44	12,25	21,50
Media n=16	39,76	5,97	24,29	9,64	20,34
DS	3,81	0,78	1,11	2,73	1,83

Tabla 3.7. Contenido relativo de fosfolípidos en muestras de leche convencional.

Fecha recogida	PE	PI	PC	PS	SM
09/03/10	47,15	6,50	23,58	6,50	16,26
23/03/10	41,67	6,25	24,31	7,64	20,14
11/06/10	44,53	5,11	26,28	5,84	18,25
29/06/10	43,79	4,73	22,49	5,92	23,07
13/07/10	45,06	4,32	24,07	6,79	19,75
06/08/10	41,67	4,55	24,24	7,58	21,97
07/09/10	40,40	5,96	25,17	6,62	21,85
27/01/11	31,84	4,79	21,95	5,87	35,55
11/05/11	30,13	6,44	24,77	12,19	21,45
12/07/11	41,18	5,28	24,82	12,53	18,55
05/08/11	38,35	6,22	24,89	11,43	20,25
14/09/11	33,47	6,63	26,34	12,57	20,99
22/09/11	38,26	6,93	24,92	11,84	19,32
18/10/11	36,10	6,35	25,28	12,70	18,14
09/11/11	38,00	6,65	24,62	11,90	18,55
12/01/12	38,12	6,26	25,15	12,16	20,78
Media n=16	39,36	5,81	24,56	9,38	20,93
DS	4,81	0,86	1,16	2,93	4,27

Los valores más elevados correspondieron a la PE seguida de la PC, SM, PS y PI, tal y como ocurre en la mayoría de los estudios realizados por otros autores (Tabla 3.5.). Cabe destacar que los resultados obtenidos en el presente trabajo, se aproximan mucho, en el perfil de fosfolípidos, a los obtenidos en el estudio llevado a cabo, también en España y en leche de vaca, por Alcalá y Fontecha (2010); aunque hay que señalar, como se comentó antes, que el contenido de fosfolípidos totales determinados en nuestro estudio (0,901 y 0,807 g por 100 g de grasa para leche ecológica y convencional respectivamente) es más del doble del valor obtenido por esos autores (0,34 g por 100 g de grasa).

3.5. BIBLIOGRAFÍA

Avalli, A., Contarini, G. (2005). Determination of phospholipids in dairy products by SPE/HPLC/ELSD. *Journal of Chromatography A*. 1071: 185-190.

Bergamo, P., Fedele, E., Iannibelli, L., Marzillo, G. (2003). Fat-soluble vitamins contents and fatty acid composition in organic and conventional Italian Dairy products. *Food Chemistry* 82: 625-631.

Bitman, J., Wood, D.L. (1990). Changes in milk fat phospholipids during lactation. *Journal of Dairy Science* 73(5): 1208-1216.

Christie, W.W., Nobel, R.C., Davies, G. (1987). Phospholipids in milk and dairy products. *Journal of Dairy Technology*. 40:10-12.

Corredig, M., Dalgleish, D.G. (1998). Effect of heating of cream on the properties of milk fat globule membrane isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46:2533-2540.

Donato, P., Cacciola, F., Cichello, F., Russo, M., Dugo, P., Mondello, L. (2011). Determination of phospholipids in milk samples by means of hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to evaporative light scattering and mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*. 1218: 6476-6482.

DOUE. (2007). Reglamento CE 834/2007 sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos y por el que se deroga el Reglamento CEE 2092/91.

Ellis, K.A., Innocent, G., Grove-White, D., Cripps, P., McLean, W.G., Howard, C.V., Mihm, M. (2006). Comparing the fatty acid composition of organic and conventional milk. *Journal of Dairy Science* 89 (6): 1938-1950.

Fagan, P., Wijesundera, C. (2004). Liquid chromatographic analysis of milk phospholipids with on-line pre-concentration. *Journal of Chromatography A*. 1054: 241-249.

Gallier, S., Gragson, D., Cabral, C., Jiménez-Flórez, R., Everett, D.W. (2010). Composition and fatty acid distribution of bovine milk phospholipids from processed milk products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 58: 10503-10511.

FIL- IDF (2000). International Standard 141C. Whole milk. Determination of milkfat, protein and lactose content. Guidance on the operation of mid-infrared instruments. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

Lopez, C., Briard-Bion, V., Ménard, O. (2014). Polar lipids, sphingomyelin and long-chain unsaturated fatty acids from the milk fat globule membrane are increased in milks produced by cows fed fresh pasture based diet during spring. *Food Research International*. 25: 59-68.

Lopez, C., Briard-Bion, V., Ménard, O., Beaucher, E., Rousseau, F., Fauquant, J., Leconte, N., Robert B. (2011). Fat globules selected from whole milk according to their size: Different compositions and structure of the biomembrane, revealing sphingomyelin-rich domains. *Food Chemistry*. 125: 355-368.

Lopez, C., Briard-Bion, V., Menard O., Rousseau, F., Pradel, P., Besle, J. M. (2008). Phospholipid, sphingolipid, and fatty acid compositions of the milk fat globule membrane are modified by diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(13): 5226-5236.

Ménard, O., Ahnad, S., Rousseau, F., Briard-Bion, V., Gaucheron, F., Lopez, C. (2010). Buffalo vs. cow milk fat globules: Size distribution, zeta-potential, compositions in total fatty acids and in polar lipids from the milk fat globule membrane. *Food Chemistry*. 120: 544-551.

Rodríguez-Alcalá, L.M., Fontecha, J. (2010). Major lipid classes separation of buttermilk, and cows, goats and ewes milk by high performance liquid chromatography with an evaporative light scattering detector focused on the phospholipid fraction. *Journal of Chromatography A*. 1217 (18): 3063-3066.

Rombaut, R., Camp, J.V., Dewettinck, K. (2005). Analysis of phospho- and sphingolipids in dairy products by a new HPLC method. *Journal of Dairy Science*. 88: 482-488.

Rombaut, R., Dewettink, K. (2006). Properties, analysis and purification of milk polar lipids. *International Dairy Journal*. 16: 1362-1373.

Rombaut, R., Van Camp, J., Dewettinck, K. (2006). Phospho- and sphingolipid distribution during processing of milk, butter and whey. *International Journal of Food Science and Technology*. 41: 435-443.







**4. FOSFOLÍPIDOS EN
LECHE RICA EN ÁCIDO
LINOLEICO
CONJUGADO (CLA) Y
EN LECHE
CONVENCIONAL**



4.1. INTRODUCCIÓN

Desde hace unos años se ha introducido en el mercado un nuevo tipo de leche, rica en ácido linoleico conjugado (18:2c) (CLA).

El CLA es el conjunto de varios isómeros del ácido linoleico que poseen dobles enlaces conjugados; el isómero más abundante en la leche de vaca es el ácido ruménico: cis-9, trans-11 octadecadienoico (Figura 4.1.), que se forma en el rumen a partir del ácido linoleico, siendo la leche y los productos lácteos sus principales fuentes en la dieta humana.

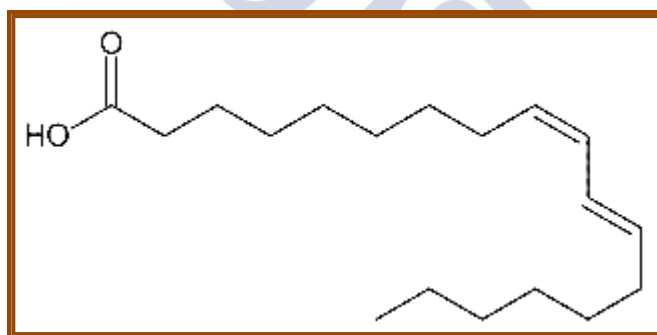


Figura 4.1. Estructura química del ácido ruménico: cis-9, trans-11 octadecadienoico.

La concentración de CLA en la grasa de la leche está comprendida entre el 0,5 y el 2%, pudiendo oscilar su concentración a lo largo del año, alcanzándose los valores máximos cuando el animal consume más hierba fresca (Mohammed y col., 2009). Roca-Fernández y col. (2012), en un estudio llevado a cabo en leches de Galicia, encontraron valores

comprendidos entre el 0,49 y el 1,14%; también estos autores observaron un mayor contenido en CLA a medida que aumentaba el aporte de hierba fresca a la dieta del animal.

Aunque los ácidos grasos trans se asocian a riesgos de enfermedades coronarias, los presentes en la grasa de la leche, principalmente el vaccénico (trans 18:1) y el CLA, pueden resultar beneficiosos.

El CLA juega un papel importante como anticancerígeno, especialmente en la prevención del cáncer de mama (Gill y Cross, 2000; Parodi, 2004) y, también, se le atribuyen propiedades adelgazantes (disminuye la grasa corporal) y anabolizantes (incrementa la masa muscular) (Mougios y col., 2001; Gaullier y col., 2004). Dado los múltiples beneficios que el CLA aporta a la dieta, en los últimos años algunas industrias han puesto en el mercado leche con una mayor concentración de este componente en la fracción grasa.

Puesto que la dieta del animal es el principal factor determinante de la concentración de CLA en la leche, se hicieron ensayos, bien aumentando el consumo de hierba verde, o bien suministrando ácido linoleico de aceites vegetales a la ración del animal, produciéndose, como consecuencia, un rápido incremento de los niveles de CLA en la grasa de la leche (Chichlowski y col., 2005; Huth y col., 2006).

Algunas industrias presentan esta leche como más beneficiosa para la salud que la leche convencional, puesto que puede llegar a contener un 18% menos de grasas saturadas, un 40% más de ácidos grasos insaturados y casi cuatro veces más CLA (Feiraco, 2012) y, además, todo esto se puede conseguir

de manera natural, modificando la alimentación de las vacas y sin la adición de ningún tipo de agregado químico a la leche.

Lopez y col. (2008) mediante la modificación de la dieta de los animales con la incorporación de alimentos ricos en ácidos grasos insaturados, como la semilla de lino, obtuvieron una leche con mayor concentración de fosfolípidos.

4.2. OBJETIVOS

Para la obtención de leche rica en CLA se modifica la dieta, principalmente mediante el aporte de semilla de lino y de una mayor proporción de ácidos grasos insaturados. En este trabajo se pretende comprobar si la dieta utilizada para incrementar el contenido en CLA, conduce, asimismo, a una mayor proporción de fosfolípidos en la leche.

El objetivo de este estudio es determinar y comparar el contenido de fosfolípidos totales y de los principales fosfolípidos (PE, PI, PC, PS y SM) en leche procedente de vacas a las que se aportó una alimentación controlada para aumentar el contenido en CLA y en leche de vaca de producción convencional.

4.3. MATERIAL Y MÉTODOS

4.3.1. MUESTRAS

Se analizaron un total de ocho pares de muestras de leche cruda de vaca, que fueron recogidas entre los meses de

abril y noviembre del año 2012 y suministradas por la Cooperativa Feiraco (Negreira, A Coruña).

Cada par de muestras incluye una muestra de leche de producción convencional y una muestra de leche rica en CLA (aproximadamente 1,8% de CLA en materia grasa), tomadas las dos en el mismo día. Las muestras de ambos tipos de leche se tomaron en los tanques de la empresa, de aproximadamente 25.000 L en el caso de la leche rica en CLA y de aproximadamente 100.000 L en el caso de la leche convencional. También en este caso las muestras pueden ser consideradas representativas para la estimación de los valores medios de la zona de recogida; en el caso de la leche rica en CLA, los 25.000 L representan aproximadamente la producción de dos días.

Las muestras se recibieron refrigeradas y, en los casos en que fue necesario, se congelaron hasta la extracción de los fosfolípidos.

Los animales que producen leche convencional y leche rica en CLA reciben raciones similares de silo de hierba (aproximadamente 10 kg por vaca y día), silo de maíz (aproximadamente 30 kg por vaca y día) y heno (aproximadamente 0,5 kg por vaca y día). Las diferencias en la alimentación radican, fundamentalmente, en la composición de los aproximadamente 11 kg de pienso diarios que recibe cada animal. En el caso de la leche rica en CLA, se suministró a las vacas un pienso suplementado con semilla de lino, adicionado de ácidos orgánicos insaturados y sales de ácidos orgánicos insaturados en lugar de sales de ácidos grasos de palma,

también se añadió aproximadamente el doble de cebada, fosfato dicálcico y cloruro sódico que en el pienso convencional y, por el contrario, una menor proporción de harina de maíz y DDGS de maíz; según se recoge en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Componentes para preparar 10 kg de pienso para vacas que producen leche convencional y leche rica en CLA.

Componentes en kg	Pienso para leche convencional	Pienso para leche rica en CLA
Harina de maíz	4,105	2,072
Soja 44	3,498	3,824
Aceites ricos en ácidos grasos insaturados		0,200
Sales de ácidos grasos insaturados		0,060
Sales de ácidos grasos de palma	0,250	
Semilla de lino		1,000
DDGS de maíz	1,000	0,300
Cascarilla de soja	1,000	0,984
Cebada	0,800	1,530
Carbonato cálcico	0,232	0,210
Bicarbonato de sodio	0,150	0,157
Urea	0,072	0,071
Cloruro sódico	0,034	0,071
Fosfato dicálcico	0,090	0,194
Óxido de magnesio		0,041
Microcorrector	0,020	0,060

4.3.2. ANÁLISIS DE LA GRASA

La determinación de la materia grasa se lleva a cabo por espectroscopía infrarroja, mediante un Milkoscan FT2 (Foss Electric LTDA, Dinamarca) según la norma FIL-IDF 141C (2000). La muestra se calienta a 40°C antes de introducirla en el analizador.

4.3.3. DETERMINACIÓN DE LOS FOSFOLÍPIDOS

Esta determinación se hace en dos etapas:

En primer lugar se lleva a cabo la extracción, para ello se pesan 10 g de muestra y se sigue el procedimiento descrito en la sección 2.3.3.3.

Una vez completada la extracción se hace la determinación cromatográfica, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 2.3.5.3.

4.3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La media aritmética, desviación típica y la prueba “t” de comparación entre pares con dos colas fueron determinadas con el programa Microsoft Excel 2003.

4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las Tablas 4.2. y 4.3. recogen los valores obtenidos para los distintos fosfolípidos, expresados como mg por kg de leche, en la leche rica en CLA y en la leche convencional

respectivamente. Las Tablas 4.4. y 4.5. recogen los valores de los mismos componentes expresados como porcentaje sobre materia grasa.

Tabla 4.2. Contenido de fosfolípidos en mg/kg de leche en muestras de leche rica en CLA.

Fecha recogida	PL	PE	PI	PC	PS	SM
06/04/2012	319,1	128,4	17,9	60,9	23,9	88,0
06/06/2012	339,8	131,6	20,7	70,4	24,5	92,7
14/06/2012	255,8	91,3	18,0	50,7	20,7	75,1
01/07/2012	318,3	132,6	17,6	63,3	23,9	81,0
04/07/2012	204,5	74,2	14,7	42,2	20,9	52,6
12/07/2012	246,7	97,2	16,9	55,2	22,0	55,6
28/09/2012	314,1	146,6	20,0	50,0	24,0	73,5
09/11/2012	218,5	90,8	12,7	36,9	16,1	62,0
Media n= 8	277,1	111,6	17,3	53,7	22,0	72,6
DS	51,9	26,2	2,6	11,1	2,8	14,7

Tabla 4.3. Contenido de fosfolípidos en mg/kg de leche en muestras de leche convencional.

Fecha recogida	PL	PE	PI	PC	PS	SM
06/04/2012	391,7	156,6	22,8	69,8	28,1	114,5
06/06/2012	353,9	132,6	18,2	69,8	22,7	110,5
14/06/2012	245,0	88,9	17,6	38,8	23,9	75,8
01/07/2012	280,3	119,7	15,9	47,8	20,2	76,7
04/07/2012	234,1	82,7	14,9	46,2	23,2	67,1
12/07/2012	321,0	126,8	19,5	63,8	25,3	85,7
28/09/2012	237,7	104,5	13,0	41,3	16,2	62,4
09/11/2012	294,8	128,7	16,4	41,8	20,4	87,5
Media n=8	304,5	121,8	17,8	54,1	23,1	87,6
DS	57,6	24,4	3,0	13,2	3,6	19,0

Tabla 4.4. Contenido de fosfolípidos en porcentaje sobre materia grasa en muestras de leche rica en CLA.

Fecha recogida	Grasa % (m/m)	PL	PE	PI	PC	PS	SM
06/04/2012	3,37	0,947	0,381	0,053	0,181	0,071	0,261
06/06/2012	3,22	1,055	0,409	0,064	0,219	0,076	0,288
14/06/2012	3,22	0,794	0,284	0,056	0,158	0,064	0,233
01/07/2012	3,00	1,061	0,442	0,058	0,211	0,080	0,270
04/07/2012	3,04	0,673	0,244	0,048	0,139	0,069	0,173
12/07/2012	3,21	0,769	0,303	0,052	0,172	0,069	0,173
28/09/2012	3,52	0,892	0,417	0,057	0,142	0,068	0,209
09/11/2012	3,48	0,628	0,261	0,036	0,106	0,046	0,178
Media n=8	3,26	0,852	0,343	0,053	0,166	0,068	0,223
DS	0,19	0,164	0,078	0,008	0,038	0,010	0,047

Tabla 4.5. Contenido de fosfolípidos en porcentaje sobre materia grasa en muestras de leche convencional.

Fecha recogida	Grasa % (m/m)	PL	PE	PI	PC	PS	SM
06/04/2012	4,04	0,970	0,388	0,056	0,173	0,070	0,283
06/06/2012	3,83	0,924	0,346	0,047	0,182	0,059	0,289
14/06/2012	3,93	0,623	0,226	0,045	0,099	0,061	0,193
01/07/2012	3,88	0,722	0,309	0,041	0,123	0,052	0,198
04/07/2012	3,52	0,665	0,235	0,042	0,131	0,066	0,191
12/07/2012	4,58	0,701	0,277	0,042	0,139	0,055	0,187
28/09/2012	4,05	0,587	0,258	0,032	0,102	0,040	0,154
09/11/2012	4,16	0,709	0,308	0,039	0,100	0,049	0,210
Media n=8	4,00	0,738	0,294	0,043	0,131	0,057	0,213
DS	0,30	0,137	0,056	0,007	0,032	0,010	0,048

Aunque el contenido medio de fosfolípidos por kg de leche fue mayor en la leche convencional que en la leche rica en CLA, la proporción se invierte cuando el contenido de fosfolípidos se expresa en porcentaje sobre materia grasa, debido a que el porcentaje medio de grasa en la leche rica en CLA (3,26%) fue mucho menor que en la leche convencional (4,00%).

El contenido medio de todos los fosfolípidos, en porcentaje sobre materia grasa, fue mayor en la leche rica en CLA que en la leche convencional. El incremento fue el 16,7% para PE, el 23,3% para PI, el 26,7% para PC, el 19,3% para PS, el 4,7% para SM y el 15,4% para los fosfolípidos totales.

Cuando se aplicó el test “t” de comparación entre pares con dos colas, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) para PI, PC y PS. Mientras que para PE y los fosfolípidos totales, los valores de $P < 0,10$ indican que hay una tendencia en la dirección de mayor contenido de fosfolípidos en la leche rica en CLA. No así en lo que concierne a SM, para la que no se encontraron diferencias entre la leche rica en CLA y la leche convencional.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio coinciden, en gran parte, con los obtenidos por Lopez y col. (2008); que al suplementar con semillas de lino la alimentación de las vacas (aproximadamente 3,4 kg por vaca y día), además de disminuir de manera significativa los ácidos grasos saturados e incrementar los insaturados, consiguieron que la concentración de fosfolípidos también fuese significativamente mayor ($P < 0,05$). El contenido de fosfolípidos totales se elevó un 18%, algo más que el incremento encontrado en el presente trabajo (15,4%), aunque hay que tener en cuenta que en nuestro trabajo el suplemento de semilla de lino fue menor, aproximadamente 1,1 kg por vaca y día. Al igual que en el presente estudio, todos los fosfolípidos aumentaron su contenido, aunque en diferente proporción que en nuestro trabajo: 19,8% PE, 10,8 % PI, 11,7% PC y 18,6% PS. Contrasta el pequeño incremento de la SM que se produjo en nuestro estudio (4,7%) frente al gran aumento (30%) que obtuvieron Lopez y col. (2008) para ese mismo componente.

Hay que hacer notar sin embargo, que igual que ocurría en la comparación entre la leche ecológica y convencional

comentada en el capítulo 3, los valores obtenidos por Lopez y col. (2008), tanto para el total de los fosfolípidos como para cada uno de ellos individualmente, son muy inferiores a los valores obtenidos en nuestro trabajo, tanto para la leche rica en CLA como para la leche convencional utilizada como referencia. Los valores obtenidos por Lopez y col. (2008) son menores, asimismo, que los obtenidos por otros autores (Bitman y Wood, 1990; Rombaut y col., 2005; Rombaut y col. 2006; Lopez y col., 2011), que obtuvieron resultados más próximos a los valores obtenidos en nuestro estudio tanto para la leche rica en CLA, como para la leche convencional utilizada como referencia.

Las diferencias entre los valores medios del contenido relativo de los distintos fosfolípidos entre la leche rica en CLA y la leche convencional son pequeñas (Tablas 4.6. y 4.7.). Oscilan entre un contenido relativo 2,28% menor para SM en la leche rica en CLA y un 1,84% mayor en PC para esta misma leche. En los dos tipos de leche los valores más elevados corresponden a PE y los más bajos a PI, igual que se había observado en el apartado 3.4. en relación a la leche ecológica y convencional.

Tabla 4.6. Contenido relativo de fosfolípidos en muestras de leche rica en CLA.

Fecha recogida	PE	PI	PC	PS	SM
06/04/2012	40,00	5,26	18,95	7,37	27,37
06/06/2012	38,67	5,66	20,75	7,55	27,36
14/06/2012	35,44	7,59	20,25	7,59	29,11
01/07/2012	41,50	5,66	19,81	7,55	25,47
04/07/2012	35,82	7,46	20,90	10,45	25,37
12/07/2012	38,96	6,49	22,08	9,09	22,08
28/09/2012	47,19	6,74	15,73	7,87	23,60
09/11/2012	41,27	6,35	17,46	7,94	28,57
Media n=8	39,86	6,40	19,49	8,18	26,12
DS	3,71	0,85	2,05	1,06	3,60

Tabla 4.7. Contenido relativo de fosfolípidos en muestras de leche convencional.

Fecha recogida	PE	PI	PC	PS	SM
06/04/2012	40,21	6,19	17,53	7,22	28,87
06/06/2012	38,04	5,44	19,57	6,52	31,52
14/06/2012	37,10	8,06	16,13	9,68	30,65
01/07/2012	43,06	5,56	16,67	6,94	27,78
04/07/2012	35,82	5,97	19,40	10,45	28,36
12/07/2012	38,89	6,94	20,83	8,33	25,00
28/09/2012	44,07	5,08	16,95	6,78	25,42
09/11/2012	46,66	5,63	14,08	7,04	29,58
Media n=8	40,48	6,11	17,65	7,87	28,40
DS	3,77	0,97	2,18	1,47	2,31

4.5. BIBLIOGRAFÍA

Bitman, J., Wood, DL. (1990). Changes in milk fat phospholipids during lactation. *Journal of Dairy Science*. 73(5): 1208-1216.

Chichlowski, M.V.; Schroeder, J.W.; Park, C.S., Keller, W.L., Schimek, D.E. (2005). Altering the fatty acid in milk by including canola seeds in dairy cattle diets. *Journal of Dairy Science*. 88(9), 3084-3094.

Feiraco (2012). <http://www.feiraco.es/leche-feiraco-unicla.htm>

Gaullier, J.M., Halse, J., Høy, K., Kristiansen, K., Fagertun, H., Vik, H., Gudmunson, O. (2004). Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y reduces body fat mass in healthy overweight humans. *American Journal of Clinical Nutrition*. 79(6) : 1118-1125.

Gill, H.S., Cross, M.L. (2000). Anticancer properties of bovine milk. *British Journal of Nutrition*. 84, suppl.1: s161-s166.

Huth, P. J., DiRienzo, D. B., Miller, G. D. (2006). Major Scientific Advances with Dairy Food in Nutrition and Health. *Journal of Dairy Science*. 89: 1207-1221.

FIL- IDF (2000). International Standard 141C. Whole milk. Determination of milkfat, protein and lactose content. Guidance on the operation of mid-infrared instruments. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

Lopez, C., Briard-Bion, V., Ménard, O., Beaucher, E., Rousseau, F., Fauquant, J., Leconte, N., Robert, B. (2011). Fat globules selected from whole milk according to their size: Different compositions and structure of the biomembrane, revealing sphingomyelin-rich domains. *Food Chemistry*. 125: 355-368.

Lopez, C., Briard-Bion, V., Menard, O., Rousseau, F., Pradel, P., Besle, J. M. (2008). Phospholipid, sphingolipid, and fatty acid compositions of the milk fat globule membrane are modified by diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(13): 5226-5236.

Mohammed, R., Stanton, C.S., Kennelly, J.J., Kramer, J.K.G., Mee, J.F., Glimm, D.R., O'Donovan, M., Murphy, J.J. (2009). Grazing cows are more efficient than zero-grazed and

grass silage-fed cows in rumenic acid production. *Journal of Dairy Science*. 92(8): 3874-3893.

Mougios, V., Matsakas, A., Petridou, A., Ring, S., Sagrados, A., Melissopoulo, A., Tsigilis, N., Nikolaidis, M. (2001). Effect of supplementation with conjugated linoleic acid on human serum lipids and body fat. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 12(10) : 585-594.

Parodi, P.W. (2004). Milk fat in human nutrition. *Australian Journal of Dairy Technology*. 59(1): 3-59.

Roca-Fernández, A.I., González-Rodríguez, A., Vázquez-Yáñez, O.P., Fernández-Casado, J.A. (2012). Effect of forage source (grazing vs. Silage) on conjugated linoleic acid content in milk fat of Holstein-Friesian dairy cows from Galicia (NW Spain). *Spanish Journal of Agricultural Research*. 10(1): 116-122.

Rombaut, R., Camp, J.V., Dewettinck, K. (2005). Analysis of phospho- and sphingolipids in dairy products by a new HPLC method. *Journal of Dairy Science*. 88: 482-488.

Rombaut, R., Van Camp, J., Dewettinck, K. (2006). Phospho- and sphingolipid distribution during processing of milk, butter and whey. *International Journal of Food Science and Technology*. 41: 435-443.



5. EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO DE FOSFOLÍPIDOS EN LA ELABORACIÓN DE QUESO FRESCO POR UF A PARTIR DE LECHE MAZADA



5.1. INTRODUCCIÓN

5.1.1. LA LECHE MAZADA

La leche mazada es la fase acuosa obtenida durante el batido de la nata en la elaboración de la mantequilla. Contiene todos los compuestos hidrosolubles de la nata, como proteínas, lactosa y minerales (Sodini y col., 2006; Vanderghem y col., 2010). Es rica en fosfolípidos debido a los fragmentos de la membrana del glóbulo graso que se liberan durante el batido y migran mayoritariamente a la fase acuosa (Corredig y col., 2003; Morin y col., 2004; Morin y col., 2006; Rombaut y col., 2007; Vanderghem y col., 2010).

La producción mundial de mantequilla en el año 2013 fue de aproximadamente 5,2 millones de toneladas (FAOSTAT, 2015), teniendo en cuenta que para la fabricación de mantequilla se parte de nata de aproximadamente el 40%, se puede estimar una producción similar de leche mazada. Durante muchos años fue considerada un subproducto de la industria láctea de bajo valor que se ha usado en alimentación animal. Hoy en día es un ingrediente ampliamente utilizado por su capacidad emulsionante, por su impacto positivo en el sabor y por el elevado contenido en fosfolípidos, que hace de la leche mazada, un ingrediente funcional y tecnológico muy interesante para la industria alimentaria (Sodini y col., 2006; Vanderghem y col., 2010).

Se usa como ingrediente en las industrias del chocolate, panadería y pastelería y, por sus propiedades emulsionantes

tiene interés en la preparación de algunos tipos de salsa (Chandan, 1997). Se emplea, asimismo, en la fabricación de helados, mejorando su resistencia al fundido y disminuyendo la arenosidad (Wong y Kitts, 2003a).

Pero quizás su utilización más importante sea en la industria láctea, en la que se puede utilizar en la fabricación de yogur y en la elaboración de queso fresco y curado. La incorporación de leche mazada favorece la retención de agua y mejora el sabor y la textura en quesos bajos en grasa, debido a que aporta fragmentos de la membrana de los glóbulos grasos, que tienen un efecto favorable en esa dirección (Mistry y col., 1996) y, por su capacidad para secuestrar iones de metales de transición como Fe^{2+} y Fe^{3+} , retarda la oxidación de las grasas (Wong y Kitts, 2003b).

Cuando se utiliza como materia prima puede ser necesario someterla a diversos tratamientos tecnológicos, entre los que se suelen incluir la homogeneización, pasteurización y coagulación. En la actualidad es frecuente, asimismo, la concentración por ultrafiltración (UF).

5.1.2. LA ULTRAFILTRACIÓN

Los procesos de separación por membrana y, en particular, los que se originan bajo la acción de un gradiente de presión (microfiltración, ultrafiltración y ósmosis inversa) así como sus aplicaciones, han alcanzado en las últimas décadas un desarrollo extraordinario, incluida su aplicación a la leche mazada (Mistry y col., 1996; Sachdeva y Buchheim, 1997;

Govindasamy-Lucey y col., 2007). La ultrafiltración consiste en un proceso de separación por membrana, impulsado por un gradiente de presión, en el que la membrana fracciona componentes de un líquido en función de su tamaño y estructura (FIL-IDF, 134, 1981). Utiliza un sistema de flujo tangencial (Figura 5.1), en el cual la solución de alimentación se hace circular paralelamente a la superficie de la membrana en condiciones de sobrepresión como fuerza impulsora de la separación. Esta dinámica de filtración evita, en gran medida, que el material retenido por la membrana permanezca en la superficie llegando a la colmatación. Como resultado de la presión aplicada y en función de las propiedades de la membrana, el solvente y ciertos solutos pasan a través de la misma. Los mecanismos que gobiernan la transferencia de masa en las diferentes técnicas de membrana varían en función del tipo de membrana, condiciones del proceso y configuración del equipo.

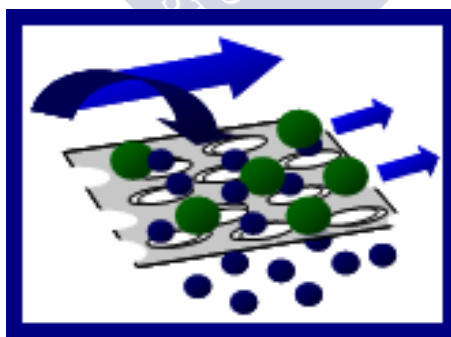


Figura 5.1. Proceso de ultrafiltración por flujo tangencial.

El concepto de ultrafiltración en la industria láctea tiene su origen en Francia en 1969. Al principio se le denominó procedimiento MMV, debido a las tres personas que lo desarrollaron: Maubois, Mocquot y Vassal (Kosikowski, 1985). Inicialmente utilizaron membranas de acetato de celulosa para ultrafiltrar leche entera, consiguiendo que la mayor parte de la lactosa, agua y sales solubles atravesaran la membrana, esta fracción es el permeado. El resto de los componentes de la leche (grasa, proteínas y sales asociadas) quedaron retenidos en la membrana, formando el concentrado.

La concentración, fraccionamiento y separación de los componentes de la leche se basa principalmente en su peso molecular, pero también en sus propiedades físico-químicas, la estructura de la membrana y la interacción de ésta con sus componentes (Sourijan, 1977).

En la actualidad, las membranas de cerámica son las más usadas, toleran amplios intervalos de pH y temperatura y se pueden esterilizar. La principal ventaja de este tipo de membranas es que, debido a su gran resistencia mecánica (40 bar), se pueden obtener concentrados de elevada viscosidad (más del 20% de proteínas). Las membranas cerámicas están constituidas por óxido de zirconio, alúmina o una combinación de ambos materiales (Fernández-Albalat, 2002).

Generalmente el peso molecular de corte en las membranas de UF está comprendido entre 10.000 y 100.000 D y el tamaño de poro entre 0,01 y 0,1 μm , que permiten el paso de los constituyentes de bajo peso molecular (agua, sales en disolución, ácidos orgánicos, lactosa y péptidos pequeños), y

retiene parcial o totalmente los componentes de mayor tamaño, como los glóbulos grasos y las proteínas de la leche. La velocidad de flujo tangencial suele ser de 2 a 5 m/s, según la configuración geométrica; y la presión media de transmembrana de 2 a 8 bar. La temperatura ideal de trabajo está comprendida entre 50 y 55 °C, la cual representa un compromiso entre la máxima difusión del permeado a través de la membrana, el control del crecimiento de bacterias contaminantes, el comportamiento reológico de los concentrados y la estabilidad de las proteínas del suero (Eck, 1987).



Figura 5.2. Equipo de ultrafiltración.

5.2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de los sucesivos tratamientos (ultrafiltración de la leche mazada, homogeneización y pasteurización, coagulación y ultrafiltración de la cuajada) sobre la concentración de los fosfolípidos (PE, PI, PC, PS y SM) a lo largo del proceso de producción de queso fresco a partir de leche mazada (QFLM).

5.3. MATERIAL Y MÉTODOS

5.3.1. ELABORACIÓN DEL QFLM

Los ensayos para la obtención de QFLM se llevaron a cabo en la empresa Innolact S.L. Se hicieron un total de cinco ensayos industriales, para los que se siguieron las etapas que se describen a continuación (Figura 5.3.):

1º Se parte de 10.000 L de leche mazada procedente de la elaboración de mantequilla por el método NIZO a partir de nata previamente pasteurizada a 90 °C durante 30 s.

2º Se calienta a 45-50 °C y se preconcentra por UF hasta la mitad del volumen inicial con membranas de 50 KDa de punto de corte, para ello se aplica una presión comprendida entre 2 y un máximo de 8 bar.

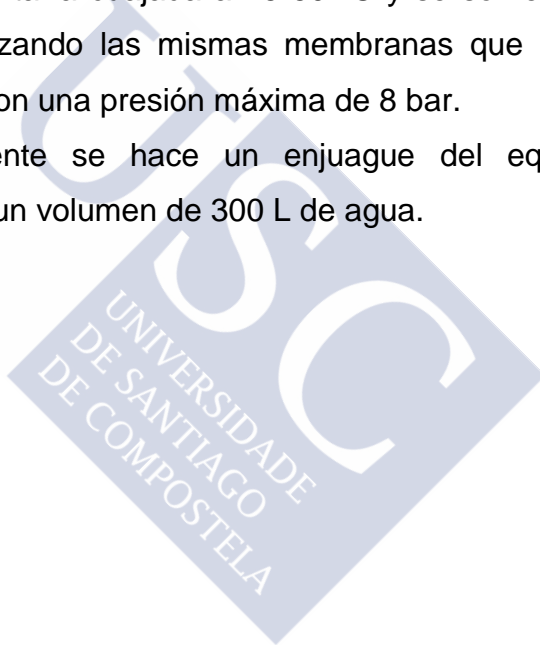
3º A la leche mazada concentrada se le añade nata de aproximadamente el 40% de materia grasa, para aumentar la relación grasa/proteína. La mezcla se pasteuriza a 90-95 °C durante 5 min, con objeto de reducir la carga microbiana y

desnaturalizar las proteínas séricas. Para mejorar la textura se homogeneiza el producto a 150 bar, al alcanzarse los 70 °C durante la pasteurización.

4º Se enfria a aproximadamente 30 °C y se inocula la mezcla con un cultivo de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* variedad *diacetylactis*, hasta alcanzar el pH 4,6 necesario para la coagulación.

5º Se calienta la cuajada a 45-50 °C y se somete a una segunda UF, utilizando las mismas membranas que en la 2º etapa y también con una presión máxima de 8 bar.

6º Finalmente se hace un enjuague del equipo de ultrafiltración con un volumen de 300 L de agua.



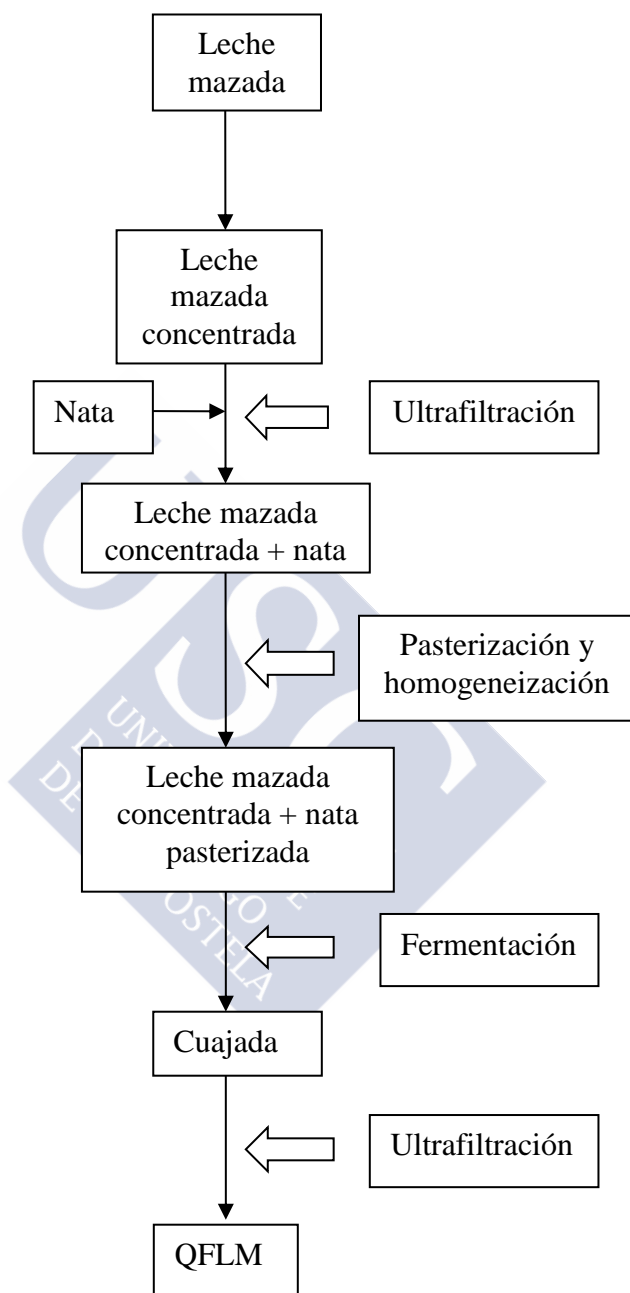


Figura 5.3. Esquema del proceso de elaboración de QFLM.

5.3.2. MUESTRAS

Se analizaron un total de 35 muestras tomadas en 5 ensayos realizados en distintos días.

En cada ensayo se tomaron muestras de cada una de las etapas del proceso: leche mazada, leche mazada concentrada, leche mazada concentrada con nata, leche mazada concentrada con nata pasteurizada, cuajada, QFLM y agua de aclarado.

Las muestras se transportaron refrigeradas y, en los casos en que fue necesario, se congelaron hasta la extracción de los fosfolípidos.

5.3.3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

5.3.3.1. ANÁLISIS DE LA GRASA

Todas las determinaciones se hacen por duplicado.

En la leche mazada la grasa se determina por espectroscopía infrarroja, mediante un Milkoscan FT2 (Foss Electric LTDA, Dinamarca), según la norma FIL-IDF 141C (2000). La muestra se calienta a 40 °C antes de introducirla en el analizador.

En el QFLM la grasa se determina por el método Van-Gulik, según la norma FIL-IDF 222 (2008), tal como se describe en la sección 2.3.2.

La determinación de la grasa para el resto de las muestras se hace por el método de Rose-Gottlieb, siguiendo la norma FIL-IDF 1D (1996), según se describe a continuación:

1. Se pesan en un tubo Mojonnier (Gerber-Funke) 10 g de muestra para la leche mazada concentrada y agua de aclarado, y 5 g de muestra y 5 mL de agua destilada para la leche mazada concentrada con nata, leche mazada concentrada con nata pasteurizada y cuajada. Se añaden 1,25 mL de amoníaco (Sigma-Aldrich) al 30% (m/m) y 10 mL de etanol (Scharlab, España) al 96% (v/v) y se agita la mezcla.

2. Se añaden 25 mL de éter dietílico (Sigma-Aldrich), se tapa y se agita el tubo con fuerza; se añaden 25 mL de éter de petróleo (Sigma-Aldrich), se tapa y se agita el tubo con fuerza de nuevo y se deja en reposo un mínimo de 8 h.

3. Pasado este tiempo se separa la capa superior a un vaso de precipitados previamente pesado.

4. Se hace una segunda y una tercera extracción repitiendo el paso 2, pero utilizando 15 mL de éter dietílico y 15 mL de éter de petróleo en lugar de los 25 mL utilizados en la primera extracción. Se deja un tiempo de reposo de 3 y 1 h para la segunda y tercera extracción respectivamente. Se separan las capas superiores de la segunda y tercera extracciones y se juntan con la obtenida en la primera.

5. Se eliminan los disolventes del extracto graso por evaporación en un baño de agua a unos 40 °C.

6. Se seca el residuo graso en estufa a 102 °C, se enfría en un desecador y se pesa.

5.3.3.2. ANÁLISIS DE LOS FOSFOLÍPIDOS

Esta determinación se hace en dos etapas:

En primer lugar se lleva a cabo la extracción, para ello se pesan 5 g de muestra y se sigue el procedimiento descrito en la sección 2.3.3.3.

Una vez completada la extracción se determinan los fosfolípidos por HPLC, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 2.3.5.3.

5.3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La media aritmética, desviación típica, y la prueba “t” de comparación entre pares con una cola fueron determinadas con el programa Microsoft Excel 2003.

5.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.4.1. LA LECHE MAZADA

La suma de las concentraciones de PE, PI, PC, PS y SM fue considerada como la concentración total de fosfolípidos.

Las Tablas 5.1., 5.2., 5.3., 5.4. y 5.5. muestran las concentraciones de PL, PE, PI, PC, PS y SM en mg/100 g de producto, desde la leche mazada cruda siguiendo todas las etapas intermedias (leche mazada concentrada, leche mazada concentrada con nata antes de pasteurizar, leche mazada concentrada con nata después de pasteurizar y cuajada) hasta el QFLM para los cinco ensayos. La Tabla 5.6. muestra los

valores medios y las desviaciones standard de las concentraciones citadas.

Tabla 5.1. Contenido de fosfolípidos en mg/100 g de producto en el ensayo 1.

Muestra	Grasa % (m/m)	PL	PE	PI	PC	PS	SM
Leche mazada cruda	0,64	145,3	53,4	10,4	35,5	23,4	22,7
Leche mazada concentrada	1,14	241,1	87,3	15,2	60,7	38,2	39,7
Leche mazada concentrada con nata	5,24	213,8	79,4	14,3	52,5	33,6	34,1
Leche mazada concentrada con nata pasterizada	4,57	207,4	76,6	13,4	50,6	33,4	33,4
Cuajada	5,51	228,7	81,7	15,0	56,1	35,7	40,3
QFLM	11,82	320,3	100,6	19,5	82,4	53,4	64,4
Agua de aclarado	4,07	190,7	70,9	11,4	48,1	27,7	32,5

Tabla 5.2. Contenido de fosfolípidos en mg/100 g de producto en el ensayo 2.

Muestra	Grasa % (m/m)	PL	PE	PI	PC	PS	SM
Leche mazada cruda	0,75	211,6	75,7	16,5	54,6	33,2	31,7
Leche mazada concentrada	1,40	261,7	88,4	18,0	73,1	34,1	48,1
Leche mazada concentrada con nata	5,12	276,7	94,3	19,7	65,8	48,8	48,1
Leche mazada concentrada con nata pasteurizada	4,84	255,8	91,8	18,0	61,4	39,0	45,5
Cuajada	5,38	267,3	94,5	18,3	65,9	39,3	49,3
QFLM	10,50	371,8	111,5	24,4	101,6	55,7	78,6
Agua de aclarado	4,47	258,0	90,9	16,8	61,0	41,5	47,8

Tabla 5.3. Contenido de fosfolípidos en mg/100 g de producto en el ensayo 3.

Muestra	Grasa % (m/m)	PL	PE	PI	PC	PS	SM
Leche mazada cruda	0,74	116,7	51,7	8,0	30,2	8,5	18,4
Leche mazada concentrada	1,33	203,3	85,1	15,5	56,0	16,4	30,4
Leche mazada concentrada con nata	3,27	234,8	97,1	17,3	62,8	20,2	37,3
Leche mazada concentrada con nata pasterizada	3,22	223,5	96,8	14,3	60,9	16,6	35,0
Cuajada	3,18	239,8	98,6	14,5	68,6	16,6	41,5
QFLM	6,48	432,2	189,5	23,9	127,3	29,8	61,7
Agua de aclarado	2,98	196,2	74,2	12,2	56,0	14,1	39,8

Tabla 5.4. Contenido de fosfolípidos en mg/100 g de producto en el ensayo 4.

Muestra	Grasa % (m/m)	PL	PE	PI	PC	PS	SM
Leche mazada cruda	0,76	147,4	64,9	10,6	34,3	9,5	28,2
Leche mazada concentrada	1,48	238,8	95,7	19,4	56,2	14,6	52,9
Leche mazada concentrada con nata	5,84	230,0	87,3	20,3	58,8	20,2	62,0
Leche mazada concentrada con nata pasterizada	5,81	185,6	63,2	19,6	58,4	13,2	32,5
Cuajada	6,03	257,9	102,5	26,9	59,5	19,1	49,8
QFLM	11,30	341,6	125,3	27,4	87,3	19,6	82,0
Agua de aclarado	3,58	93,9	40,8	7,6	20,1	6,4	19,0

Tabla 5.5. Contenido de fosfolípidos en mg/100 g de producto en el ensayo 5.

Muestra	Grasa % (m/m)	PL	PE	PI	PC	PS	SM
Leche mazada cruda	0,74	149,0	58,7	10,3	43,6	8,7	27,7
Leche mazada concentrada	1,48	216,2	81,2	15,2	49,8	15,9	54,0
Leche mazada concentrada con nata	5,90	201,1	67,2	22,2	63,1	12,9	35,8
Leche mazada concentrada con nata pasterizada	6,01	184,0	62,5	20,4	56,2	12,3	32,6
Cuajada	6,32	289,6	116,8	21,8	76,9	19,6	54,6
QFLM	11,50	403,8	141,2	28,3	135,3	22,3	76,7
Agua de aclarado	4,36	114,1	37,3	8,1	41,5	6,0	21,2

Tabla 5.6. Contenido medio de fosfolípidos en mg/100 g de producto en los cinco ensayos.

Muestra	Grasa % (m/m)	PL	PE	PI	PC	PS	SM
Leche mazada cruda	0,73 ±0,05	154,0 ±34,8	60,9 ±9,7	11,1 ±3,2	39,6 ±9,7	16,7 ±11,2	25,7 ±5,2
Leche mazada concentrada	1,37 ±0,14	232,2 ±22,8	87,5 ±5,32	16,7 ±1,9	59,2 ±8,7	23,8 ±11,3	45,0 ±10,0
Leche mazada concentrada con nata	5,07 ±1,07	231,3 ±28,7	85,0 ±12,1	18,8 ±3,0	60,6 ±5,2	25,7 ±15,4	41,1 ±7,6
Leche mazada concentrada con nata pasteurizada	4,89 ±1,12	211,3 ±29,8	78,2 ±15,8	17,2 ±15,8	57,5 ±4,4	22,6 ±12,7	35,8 ±5,5
Cuajada	5,28 ±1,24	256,7 ±23,8	98,8 ±12,7	19,3 ±5,2	65,4 ±8,1	26,1 ±10,6	47,1 ±6,1
QFLM	10,32 ±2,20	374,0 ±45,3	133,6 ±34,7	24,7 ±3,5	106,8 ±23,6	36,2 ±17,2	72,7 ±9,1
Agua de aclarado	3,89 ±0,62	170,6 ±66,7	62,8 ±23,0	11,2 ±3,7	45,3 ±16,0	19,1 ±15,3	32,1 ±12,2

Las Tablas 5.7., 5.8., 5.9., 5.10. y 5.11. muestran los contenidos relativos de fosfolípidos de las siete etapas en los cinco ensayos y la Tabla 5.12. muestra los contenidos relativos medios.

Tabla 5.7. Contenido relativo de fosfolípidos en el ensayo 1.

Muestra	PE	PI	PC	PS	SM
Leche mazada cruda	36,76	7,13	24,40	16,10	15,61
Leche mazada concentrada	36,21	6,31	25,19	15,83	16,45
Leche mazada concentrada con nata	37,12	6,69	24,54	15,72	15,93
Leche mazada concentrada con nata pasteurizada	36,94	6,48	24,37	16,08	16,12
Cuajada	35,71	6,57	24,51	15,61	17,61
QFLM	31,41	6,09	25,72	16,67	20,11
Agua de aclarado	37,18	5,99	25,23	14,53	17,06

Tabla 5.8. Contenido relativo de fosfolípidos en el ensayo 2.

Muestra	PE	PI	PC	PS	SM
Leche mazada cruda	35,75	7,79	25,79	15,69	14,98
Leche mazada concentrada	33,79	6,87	27,95	13,03	18,37
Leche mazada concentrada con nata	34,08	7,11	23,79	17,64	17,38
Leche mazada concentrada con nata pasteurizada	35,88	7,05	24,01	15,26	17,79
Cuajada	35,37	6,83	24,67	14,69	18,44
QFLM	29,99	6,56	27,32	14,98	21,15
Agua de aclarado	35,23	6,51	23,66	16,08	18,53

Tabla 5.9. Contenido relativo de fosfolípidos en el ensayo 3.

Muestra	PE	PI	PC	PS	SM
Leche mazada cruda	44,26	6,86	25,84	7,28	15,76
Leche mazada concentrada	41,83	7,62	27,55	8,06	14,94
Leche mazada concentrada con nata	41,37	7,37	26,75	8,62	15,90
Leche mazada concentrada con nata pasteurizada	43,30	6,39	27,26	7,40	15,64
Cuajada	41,12	6,05	28,59	6,92	17,32
QFLM	43,84	5,52	29,45	6,90	14,28
Agua de aclarado	37,83	6,21	28,52	7,17	20,28

Tabla 5.10. Contenido relativo de fosfolípidos en el ensayo 4.

Muestra	PE	PI	PC	PS	SM
Leche mazada cruda	44,00	7,16	23,25	6,45	19,15
Leche mazada concentrada	40,07	8,13	23,52	6,11	22,16
Leche mazada concentrada con nata	37,95	8,84	25,56	5,72	21,94
Leche mazada concentrada con nata pasteurizada	34,07	10,58	31,46	6,41	17,48
Cuajada	39,76	10,44	23,06	7,41	19,33
QFLM	36,67	8,01	25,56	5,74	24,01
Agua de aclarado	43,51	8,14	21,36	6,79	20,20

Tabla 5.11. Contenido relativo de fosfolípidos en el ensayo 5.

Muestra	PE	PI	PC	PS	SM
Leche mazada cruda	39,40	6,90	29,26	5,86	18,58
Leche mazada concentrada	37,58	7,04	23,02	7,36	24,99
Leche mazada concentrada con nata	33,40	11,02	31,36	6,43	17,80
Leche mazada concentrada con nata pasterizada	33,99	11,06	30,54	6,71	17,70
Cuajada	40,31	7,52	26,54	6,77	18,86
QFLM	34,97	7,01	33,49	5,53	19,00
Agua de aclarado	32,72	7,11	36,37	5,22	18,58

Tabla 5.12. Contenido relativo medio de fosfolípidos en los cinco ensayos.

Muestra	PE	PI	PC	PS	SM
Leche mazada cruda	40,03	7,17	25,71	10,28	16,82
Leche mazada concentrada	37,90	7,19	25,45	10,08	19,38
Leche mazada concentrada con nata	36,78	8,20	26,40	10,82	17,79
Leche mazada concentrada con nata pasteurizada	36,84	8,31	27,53	10,37	16,95
Cuajada	38,45	7,48	25,48	10,28	18,31
QFLM	35,38	6,64	28,31	9,96	19,71
Agua de aclarado	37,29	6,79	27,03	9,95	18,93

El contenido medio de PL en la leche mazada (Tabla 5.6.) es aproximadamente cinco veces mayor que en las leches estudiadas en los capítulos 3 (Tabla 3.2.) y 4 (Tabla 4.3.). Esta relación está comprendida entre las cuatro y siete veces mayor concentración de PL en leche mazada que en leche, encontrados por Christie y col. (1987) y Elling y col. (1996) respectivamente. El mayor contenido de fosfolípidos en la leche

mazada con respecto a la leche, se debe a que durante el batido de la nata se rompen los glóbulos grasos, pasando mayoritariamente a la leche mazada los fragmentos hidrofílicos de la membrana que contienen la mayor parte de fosfolípidos (Corredig y col., 2003; Morin y col., 2004; Morin y col., 2006; Rombaut y col., 2007; Vanderghem y col., 2010). Por el contrario, casi toda la grasa se agrupa en forma de granos que, finalmente, se separan como mantequilla. Como la mantequilla retiene, proporcionalmente, mucha mayor cantidad de grasa que de fosfolípidos, cuando las concentraciones de fosfolípidos se expresan en porcentaje sobre materia grasa, la relación entre las concentraciones de PL entre la leche mazada (21,1%) y las leches estudiadas en los capítulos 3 (Tabla 3.4.) y 4 (Tabla 4.5.) es mucho mayor (26-29) que cuando esa relación se expresa en porcentaje de materia total.

Si se compara el perfil medio de fosfolípidos entre la leche y la leche mazada (Tablas 3.7., 4.7. y 5.12), destaca el menor porcentaje de SM en la leche mazada en relación con la leche. Esto probablemente se debe a que los fragmentos de la membrana de los glóbulos grasos, que contienen una mayor proporción de SM, están más fuertemente unidos a las gotas de grasa; mientras que los fragmentos con menor proporción de SM se liberan con más facilidad durante el batido de la nata y pasan en mayor proporción a la leche mazada (Britten y col., 2008); como consecuencia, estos autores encuentran un importante incremento de la proporción de SM en la fase acuosa de la mantequilla.

Al comparar los resultados de este estudio con los valores obtenidos por otros autores, se obtienen distintas conclusiones según se expresen sobre materia total o sobre materia grasa. El contenido medio de PL en la leche mazada obtenido en este estudio, es más elevado que los 90 mg/100 g de producto encontrados por Christie y col. (1987) y los 84,7 mg/100 g encontrados por Rombaut y col. (2007) para leche mazada dulce, como la utilizada en este estudio, y es similar a los 130 mg/100 g obtenidos por Britten y col. (2008). Sin embargo, si se expresa en porcentaje sobre materia grasa, el 21,1% de nuestro estudio está más cerca del 20,1% encontrado por Rombaut y col. (2007) y es mucho más elevado que el 13,3% obtenido por Britten y col. (2008). Por este motivo es importante conocer el porcentaje de grasa del producto estudiado.

El perfil medio de fosfolípidos de nuestro estudio (Tabla 5.12.), muestra una proporción similar en PE, PI, PC y PS y algo más baja en SM que la encontrada por Britten y col. (2008) (39,0, 8,9, 24,4, 8,3 y 19,3%, para PE, PI, PC, PS y SM respectivamente) y, en relación con los valores obtenidos por Rombaut y col. (2007) para leche mazada dulce (46,5, 9,6, 20,7, 9,3, 13,9% para PE, PI, PC, PS y SM respectivamente), la proporción es algo menor en PE y PI y algo mayor en PC, PS y SM.

5.4.2. CONCENTRACIÓN DE LA LECHE MAZADA

Al reducir la leche mazada a mitad de volumen mediante UF la grasa se concentra, por término medio, a casi al doble de

su concentración inicial, pasando de 0,73% en la leche mazada a 1,37% en la leche mazada concentrada. Esto se debe a que no pasa a través de la membrana de UF, aunque una pequeña parte puede quedar retenida sobre la membrana y perderse, finalmente, en el aclarado y lavado del equipo.

Mientras que en procesos de microfiltración con tamaño de poro de 0,1 μm (Morin y col., 2004) y 0,45 μm (Morin y col., 2006) se detectaron niveles de transmisión a través de la membrana del 5,8 y 12,66% de fosfolípidos respectivamente, en ninguno de los análisis de permeado de UF de los cinco ensayos realizados en este estudio se han detectado fosfolípidos, lo que indica que no atraviesan la membrana, a pesar de que su peso molecular es inferior al punto de corte de las membranas de UF utilizadas (50 kDa). Esto puede ser debido a tres causas: 1) la leche mazada tiene un elevado contenido en fragmentos de la membrana de los glóbulos grasos, ricos en fosfolípidos, pero que como están unidos a estructuras más grandes no atraviesan las membranas UF; 2) durante la pasteurización de la nata (90 °C 30 s), previa al batido, se establecen uniones entre la membrana de los glóbulos grasos y las proteínas séricas, principalmente la β -lactoglobulina (Correding y Dalgleish, 1997; Corredig y Dalgleish, 1998; Je Lee y Sherbon, 2002; Ye y col., 2004; Morin y col., 2007); y 3) durante el batido de la nata se establecen interacciones entre la caseína y la membrana de los glóbulos grasos (Morin y col., 2007). Los compuestos resultantes de estas uniones, por su tamaño, no pueden atravesar las membranas UF.

Sin embargo, a pesar de que los fosfolípidos no atraviesan las membranas, su contenido no se duplica tras la concentración por UF de la leche mazada a mitad de volumen, como cabría esperar. Para comparar el doble del contenido en fosfolípidos en la leche mazada inicial y el contenido en la leche mazada concentrada por UF a mitad de volumen, se aplicó el test “t” de comparación entre pares con una cola, puesto que en este proceso solo puede haber pérdidas de fosfolípidos, nunca incrementos. Se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0,05$), para PL, PE, PI, PC y SM; y se obtuvo un valor $P < 0,10$ para PS, que indica una tendencia en el sentido de una concentración menor al doble de la concentración de la leche mazada inicial.

El porcentaje de pérdidas varía entre los distintos ensayos. Si se exceptúa la SM, se observa en general, aunque no siempre, una tendencia a mayores pérdidas cuanto mayor es la concentración inicial del fosfolípido, siendo las pérdidas medias de PL del 24,6% y las de cada fosfolípido individual: 28,1, 25,2, 25,3 y 28,5% para PE, PI, PC y PS respectivamente, todos estos valores muy próximos entre sí, pero muy distantes del 12,6% de pérdida de SM. Estas pérdidas son debidas a los fosfolípidos que quedan retenidos en el equipo de UF; parte de los cuales se encuentran formando la capa de polarización sobre las membranas UF y se eliminan en el agua de aclarado (Tabla 5.6.). Mientras que otra parte, que queda retenida en la capa de colmatación directamente sobre la membrana, no se elimina al enjuagar con agua y se tiene que destruir mediante agentes químicos en el proceso de limpieza final y, por lo tanto, no se puede determinar analíticamente.

Las diferencias en el contenido de fosfolípidos entre la concentración de estos en la leche mazada y su concentración en la leche mazada concentrada, son menores cuando ambas concentraciones se expresan sobre materia grasa. La concentración de PL pasa del 21,1% en la leche mazada al 17,0% en la leche mazada concentrada. Esto se debe a que en el agua de aclarado y en la membrana también se producen pérdidas de grasa, aunque en menor cuantía (6,2% de media) que las pérdidas de fosfolípidos. Los porcentajes medios de descenso de concentraciones fueron muy similares 23,4, 20,3, 20,4 y 23,7% para PE, PI, PC y PS respectivamente. Mientras que en el caso de SM (6,8%), ese porcentaje es mucho menor que el de los demás fosfolípidos y muy similar al de grasa; esto se explicaría, como ya se comentó anteriormente, porque los fragmentos de la membrana de los glóbulos grasos ricos en SM se unen más fuertemente a la grasa (Britten y col., 2008).

5.4.3. HOMOGENEIZACIÓN Y PASTEURIZACIÓN

A la leche mazada concentrada se le añadió nata (aproximadamente al 40% de grasa), con objeto de elevar el contenido en grasa y, posteriormente, se homogeneizó (70 °C, 150 bar) y pasteurizó (90-95 °C, 5 min) la mezcla.

La homogeneización aumenta la relación superficie/volumen de los glóbulos grasos, favoreciendo la adsorción de caseínas sobre las membranas y favoreciendo, asimismo, las interacciones de las proteínas séricas con las proteínas de la membrana (Je Lee y Sherbon, 2002).

Posteriormente, al someter la mezcla a tratamiento térmico, se unen por enlaces covalentes algunos de los fragmentos de los glóbulos grasos a las proteínas séricas y éstas se desnaturalizan y se insolubilizan (Corredig y Dalgleish, 1998); por lo que cabe esperar que se pierdan parte de ellas sobre las paredes del pasteurizador (fouling) junto con los fosfolípidos que llevan unidos. Este hecho se confirma al aplicar el test “t” de comparación entre pares con una cola a la mezcla, antes y después de la homogeneización y pasteurización. Se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) para PL, PI y PC; y se obtuvo un valor de $P < 0,10$ para PE, PS y SM, que se interpreta como una tendencia en el sentido de pérdidas de estos fosfolípidos en esta etapa.

En la Tabla 5.6. se observan valores de fosfolípidos más bajos después de la homogeneización y pasteurización. Las pérdidas medias de PL fueron el 8,6%; algo mayores que el 7,0% encontrado por Morin y col. (2007) tras la pasteurización, en su caso más suave (85 °C, 20 s), de la leche mazada. El porcentaje medio de pérdida para cada fosfolípido fue: 8,0, 8,5, 5,1, 12,0 y 13,0% para PE, PI, PC, PS y SM respectivamente, cambiando poco el porcentaje relativo de fosfolípidos entre antes y después de la homogeneización y pasteurización (Tabla 5.12.).

5.4.4. FERMENTACIÓN Y COAGULACIÓN

Después de pasteurizada y homogeneizada la mezcla, se inocula con un cultivo de bacterias lácticas y se incuba hasta pH

4,6. Durante el proceso de fermentación aumenta el número de bacterias, con la consiguiente formación de membranas celulares. Por lo tanto, cabe esperar en esta etapa un aumento del contenido de fosfolípidos. Este hecho se confirma al aplicar el test “t” de comparación entre pares con una cola, entre el producto pasteurizado en la etapa anterior y la cuajada. Se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0,05$), para PL, PC, PS y SM y valores de $P \leq 0,10$ para PE y PI, que también indican una tendencia hacia el incremento de estos fosfolípidos en la etapa de fermentación y coagulación

El incremento medio en esta etapa fue del 21,5% para PL y para cada uno de los fosfolípidos: 26,4, 12,5, 13,7, 15,1 y 31,6% para PE, PI, PC, PS y SM respectivamente.

5.4.5. CONCENTRACIÓN DE LA CUAJADA

Al concentrar por UF la cuajada a mitad de volumen, aumenta el porcentaje de grasa a casi el doble, pasando de 5,28 a 10,32% para los valores medios; con apenas un 2,3% de pérdida. Sin embargo, igual que ocurre cuando se concentra la leche mazada, el porcentaje medio de descenso del contenido de fosfolípidos es mucho mayor. Al aplicar el test “t” de comparación entre pares con una cola, se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) para todos los fosfolípidos. Las pérdidas medias en esta etapa fueron: 27,1, 32,4, 36,0, 18,3, 30,6 y 22,8% para PL, PE, PI, PC, PS y SM respectivamente. Si se exceptúa la PC, los porcentajes de pérdidas fueron algo mayores para todos los fosfolípidos en esta

etapa que en la etapa de concentración de la leche mazada; probablemente debido a que, al tratarse de un producto con un contenido mucho más elevado en materia seca, queda más cantidad de depósitos sobre la membrana de UF (fouling) en las capas de polarización y de colmatación. Además, los depósitos de fosfolípidos en estas capas también se puede ver incrementado por el efecto que tiene la homogeneización antes del tratamiento térmico, favoreciendo las interacciones entre las proteínas de la membrana y las proteínas séricas y favoreciendo, asimismo, la adsorción de la caseína sobre los glóbulos grasos (Je Lee y Sherbon, 2002). También en este caso los descensos de concentraciones son algo menores cuando se expresan sobre materia grasa: 25,5, 31,0, 35,1, 16,9, 28,6 y 21,3% de PL, PE, PI, PC, PS y SM respectivamente debido a que, como se expuso más arriba, hubo una pequeña pérdida de grasa (2,3%).

5.4.6. QUESO FRESCO

Como se ha visto en las subsecciones anteriores, a medida que avanza el proceso de elaboración de queso fresco aumenta la concentración de fosfolípidos expresada sobre materia total, excepto en la etapa de pasteurización y homogeneización.

En la Tabla 5.12. se observa que el perfil medio de fosfolípidos varía poco a lo largo de todas las etapas de elaboración, desde la leche mazada utilizada como materia

prima hasta la obtención del queso fresco. El fosfolípido más abundante es siempre PE seguido de PC, SM, PS y PI.

El contenido medio de PL del QFLM elaborado en este trabajo (Tabla 5.6.) es algo más elevado que los 310 mg/100 g de producto determinados por Rombaut y col. (2006) en queso fresco con el 1,05% de grasa, elaborado también a partir de leche mazada. Sin embargo, el 10,32% de grasa del QFLM elaborado en nuestro estudio, hace que si las concentraciones se expresan en porcentaje de grasa, la diferencia se invierta y se ensanche hasta un 29,5% en PL de Rombaut y col. (2006) frente al 3,6% de nuestro estudio; este cambio es debido a la tendencia que tienen los fosfolípidos a pasar a la fase acuosa, como se ha comentado en la sección 5.4.1.

Una vez finalizado el proceso productivo y antes de la limpieza con agentes químicos, se enjuagaron las membranas UF con 300 L de agua, con objeto de arrastrar los depósitos que quedaron sobre ellas. Al analizar la composición del agua con los arrastres, se encontró una concentración media de PL de 170,6 mg/100 g de agua (Tabla 5.6.), que supone un 45,6% de la concentración de PL en el QFLM, con un similar perfil de fosfolípidos. No es posible determinar la totalidad de fosfolípidos que quedan sobre la membrana, puesto que parte de ellos no son arrastrados por el agua y tienen que ser destruidos por la acción final de los agentes químicos de limpieza.

5.5. BIBLIOGRAFÍA

Britten, M., Lamothe, S., Robitaille, G. (2008). Effect of cream treatment on phospholipids and protein recovery in butter-making process. *International Journal of Food Science and Technology*. 43:651-657.

Chandan, R. (1997). *Dairy based-ingredients*. Eagan Press, St. Paul, MN.

Christie, W.W., Nobel, R.C., Davies, G. (1987). Phospholipids in milk and dairy products. *Journal of Dairy Technology*. 40: 10-12.

Corredig, M., Dalgleish, D.G. (1997). Isolates from industrial buttermilk: emulsifying properties of materials derived from the milk fat globule membrane. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45:4595-4600.

Corredig, M., Dalgleish, D.G. (1998). Effect of heating of cream on the properties of milk fat globule membrane isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46:2533-2540.

Corredig, M., Roesch, R.R., Dalgleish, D.G. (2003). Production of a novel ingredient from buttermilk. *Journal of Dairy Science*. 86:2744-2750.

Documento FIL- IDF 134. (1981). *Membranes processes. Guidelines for testing of equipment: terms and definitions*.

Eck, A. (1987). *Cheesemaking: science and technology*. Lavoisier publishing. París. Francia.

Elling, J.L., Duncan, S.E., Keenan, T.W., Eigel, W.N., Boling, J. (1996). *Composition and microscopy of reformulated*

creams from reduced-cholesterol butteroil. *Journal of Food Science*. 61:48-53.

FAOSTAT. (2015). World Cow Butter Production, http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/*/E

Fernández-Albalat, M.P. (2002). Aplicación de la ultrafiltración en la elaboración de un queso tipo Cebreiro. Tesis doctoral.

FIL- IDF (1996). International Standard 1D. Determination of fat content-Gravimetric method (Rose-Gotlieb Reference method). International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

FIL- IDF (2000). International Standard 141C. Whole milk. Determination of milkfat, protein and lactose content. Guidance on the operation of mid-infrared instruments. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

FIL- IDF (2008). International Standard 222. Cheese. Determination of fat content. Van Gulik method. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

Govindasamy-Lucey, S., Lin, T., Jaeggi, J.J., Martirelli, C.J., Johnson, M.E., Lucey, J.A. (2007). Effect of type of concentrated sweet cream buttermilk on the manufacture, yield and functionality of pizza cheese. *Journal of Dairy Science*. 90:2675-2688.

Je Lee, S., Sherbon, J.W. (2002). Chemical changes in bovine milk fat globule membrane caused by heat treatment and homogenization of whole milk. *Journal of Dairy Research*. 69:555-567.

Kosikowski, F.V. (1985). Ultrafiltration of milk on French farms and in the making of a new specialty cheese industry. *Journal of Dairy Science*. 68: 2403-2410.

Mistry, V.V., Metzger, L.E., Maubois, J.L. (1996). Use of ultrafiltered sweet buttermilk in the manufacture of reduced fat cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*. 79: 1137-1145.

Morin, P., Jiménez-Flores, R., Pouliot, Y. (2004). Effect of temperature and pore size on the fractionation of fresh and reconstituted buttermilk by microfiltration. *Journal of Dairy Science*. 87: 267-273.

Morin, P., Jiménez-Flores, R., Pouliot, Y. (2007). Effect of processing on the composition and microstructure of buttermilk and its milk fat globules membranes. *International Dairy Journal*. 17(10):1179-1187.

Morin, P., Pouliot, Y., Jiménez-Flores, R. (2006). A comparative study of the fractionation of regular buttermilk and whey buttermilk by microfiltration. *Journal of Food Engineering*. 77:521-528.

Rombaut, R., Dewettinck, K., Camp, J.V. (2007). Phospho- and sphingolipid content of selected dairy products as determined by HPLC coupled to an evaporative light scattering detector (HPLC-ELSD). *Journal of Food Composition and Analysis*. 20:308-312.

Rombaut, R., Van Camp, J., Dewettinck, K. (2006). Phospho- and sphingolipid distribution during processing of milk, butter and whey. *International Journal of Food Science and Technology*. 41: 435-443.

Sachdeva, S., Bucheim, W. (1997). Recovery of phospholipids from buttermilk using membrane processing. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*. 49 (1):47-68.

Sodini, I., Morin, P., Olabi, A., Jiménez-Flores, R. (2006). Composition and functional properties of buttermilk: A comparison between sweet, sour, and whey buttermilk. *American Dairy Science Association*. 89: 525-536.

Sourirajan, S. (1977). Reverse osmosis - a general separation technique. In: Sourirajan, S. Ed: *Reverse Osmosis and Synthetic Membranes*. Ottawa. Canadá.

Vanderghem, C., Bodson, P., Danthine, S., Paquot, M., Deroanne, C., Blecker, C. (2010). Milk fat globule membrane and buttermilks: from composition to valorization. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*. 14(3):485-500.

Wong, P.Y.Y., Kitts, D.D. (2003a). A comparison of the buttermilk solids functional properties to nonfat dried milk, soy protein isolate, dried egg white, and egg yolk powders. *Journal of Dairy Science*. 86: 746-754.

Wong, P.Y.Y., Kitts, D.D. (2003b). Chemistry of buttermilk solid antioxidant activity. *Journal of Dairy Science*. 86:1541-1547.

Ye, A., Harjinder, S., Oldfield, D.J., Anema, S. (2004). Kinetics of heat-induced association of β -lactoglobulin and α -lactalbumin with milk fat globule membrane in whole milk. *International Dairy Journal*. 14:389-398.



**6. EVOLUCIÓN DEL
CONTENIDO DE
FOSFOLÍPIDOS EN LA
ELABORACIÓN DE
QUESO FRESCO POR EL
MÉTODO
TRADICIONAL**



6.1. INTRODUCCIÓN

Según el Real Decreto 1113/2006 (BOE, 2006) se define como queso fresco, atendiendo a su maduración, el que está dispuesto para el consumo al finalizar el proceso de fabricación. Su contenido graso es variable, aunque por lo general son variedades de bajo contenido graso, pero en ocasiones se elaboran con leche enriquecida con nata.

Según su contenido en grasa, expresado en porcentaje sobre el extracto seco, el queso fresco se puede clasificar como:

- Extragrasso, el que contenga un mínimo de 60%.
- Grasso, el que contenga un mínimo del 45 y menos de 60%.
- Semigrasso, el que contenga un mínimo del 25 y menos de 45%.
- Semidesnatado, el que contenga un mínimo del 10 y menos del 25%.
- Desnatado, el que contenga menos del 10%.

Los quesos frescos se obtienen principalmente a partir de leche pasteurizada de vaca, aunque también se pueden fabricar a partir de leche de oveja o cabra. Para su elaboración se emplean cultivos de bacterias lácticas acidificantes, aunque a ciertos quesos también se les añade cuajo. Tras unas horas de incubación se forma la cuajada y se escurre de forma suave. El queso resultante es de color blanco puro, de consistencia cremosa, gusto suave y su conservación está limitada a unos días bajo refrigeración.

La pérdida de agua, que acompaña a la fabricación del queso, promueve la concentración de los principios nutritivos de

la leche. En general, los quesos frescos destacan por su contenido de calcio y proteínas de alto valor biológico; también contienen fósforo, magnesio, vitamina A y algunas vitaminas del grupo B (especialmente, riboflavina, niacina y B₁₂).

En España el consumo directo de queso fresco desde junio de 2013 a mayo de 2014 fue de 2,33 kg por persona (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2014).

Existen distintas variedades de quesos frescos. Los más conocidos son (Battistotti y col., 1985; Teubner y col., 2007):

- Queso de Burgos: es el queso fresco más popular en España, elaborado a partir de leche pasteurizada de vaca u oveja, cuajo y sal. Es un queso de coagulación predominantemente enzimática. Existen en el mercado variantes sin sal y de bajo contenido graso. Muy parecido al queso de Burgos es el de Villalón.

- Cottage: aunque originario de Europa central, es un queso muy consumido en el Reino Unido y en los Estados Unidos. Se elabora a partir de leche desnatada o semidesnatada, a la que se le agrega un cultivo de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* y *Lc. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* y *Leuconostoc*, que le proporciona el sabor suave que lo caracteriza, y también se le añade una pequeña cantidad de cuajo. Es de aspecto granulado, ideal para preparaciones dulces o saladas, de bajo aporte en grasas y alto contenido en proteínas, por lo que es recomendable para dietas de adelgazamiento.

- Feta: es un queso blanco de origen griego, suave, repleto de hoyos pequeños y desiguales, que carece de corteza exterior. El nombre viene del corte en pedazos (feta en griego) después de la elaboración. Originalmente se obtenía de leche de oveja y cabra, actualmente también se utiliza la leche de vaca. Su consumo en Grecia es muy elevado, principalmente en ensaladas.

- Mascarpone: es un queso italiano procedente de Lombardía con un alto contenido graso, que se fabrica a partir de nata de leche de vaca y se coagula por adición de ácido cítrico.

- Quark: es el queso fresco más consumido en Alemania, de consistencia cremosa y sabor algo ácido. Se somete a un proceso de coagulación ácida con un cultivo a base de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Se elabora a partir de leche desnatada o semidesnatada de vaca, por lo que es el queso fresco que menos grasas y calorías aporta, aunque en ocasiones se le adiciona nata.

- Suisse o petit-suisse: es un queso fresco que, a pesar de su nombre, tiene su origen en la región francesa de Normandía, se elabora a partir de leche de vaca con adición de nata y azúcar, además de saborizantes y colorantes, resultando más atractivo y apetecible, pero menos saludable. Tiene una textura suave y cremosa, y está enfocado a la población infantil. También se comercializan variantes bajas en grasa.

- Philadelphia: es un queso fresco de origen norteamericano, suele ser rico en grasa y puede llevar aromatizantes.

- Requesón o queso de suero: según la legislación alimentaria (Deleuze, 2006) se define al requesón como: “el producto obtenido precipitando por el calor, en medio ácido, las proteínas que existen en el suero del queso para formar una masa blanda”. Se elabora calentando a 90 °C el suero que se produce en la fabricación de los demás quesos, con objeto de provocar la precipitación de las proteínas y formar una masa sólida. Los más conocidos son principalmente el Ricota italiano y también el Zieger alemán.

6.2. OBJETIVOS

En la bibliografía se ha visto que hay poco publicado en relación con el contenido de fosfolípidos en queso fresco y menos aún en suero; en este estudio se pretende contribuir a rellenar ese vacío.

El objetivo de este trabajo es estudiar la evolución del contenido de fosfolípidos (PE, PI, PC, PS y SM) en el proceso de fabricación del queso fresco y determinar su distribución entre el suero y el queso.

6.3. MATERIAL Y MÉTODOS

6.3.1. ELABORACIÓN DEL QUESO FRESCO

Se hicieron tres fabricaciones en distintos días, en las instalaciones de la empresa Lácteos Lorán S.L. (Abadín, Lugo), según el procedimiento que se describe a continuación:

Se parte de 1000 L de leche cruda, se pasteuriza a 78 °C durante 15 s, se enfría a 26 °C, se añaden fermentos lácticos (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* variedad *diacetylactis*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus rhamnosus*) y 50 mL de cuajo; se deja en reposo durante un tiempo comprendido entre 16 y 18 horas hasta que, al alcanzar un pH de 4,6, la leche se coagula. Una vez coagulada se introduce la cuajada en sacos de tela, que se cuelgan durante 24 horas a temperatura ambiente para extraer el suero por gravedad (Figura 6.1.). Al finalizar esta fase se mezcla para uniformizar la textura y la humedad. El producto resultante, unos 300 kg de queso fresco, está listo para ser envasado y consumido (Figura 6.2.).



Figura 6.1. Desuerado de queso fresco en sacos de tela.

En cada fabricación se recogieron muestras de leche cruda, suero y queso fresco.

Las muestras se transportaron refrigeradas y, en los casos en que fue necesario, se congelaron hasta la extracción de los fosfolípidos.

Todas las determinaciones se hicieron por duplicado.



Figura 6.2. Envasado de queso fresco.

6.3.2. ANÁLISIS DE LA GRASA

En la leche cruda y el suero, la materia grasa se determina por espectroscopía infrarroja, mediante un Milkoscan FT2 (Foss Electric LTDA, Dinamarca) según la norma FIL-IDF 141C (2000). Las muestras se calientan a 40 °C antes de introducirlas en el analizador.

En el queso fresco la grasa se determina siguiendo el método de Van-Gulik, según la norma FIL-IDF 222 (2008), como se describe en la sección 2.3.2.

6.3.3. DETERMINACIÓN DE LOS FOSFOLÍPIDOS

Esta determinación se hace en dos etapas:

En primer lugar se lleva a cabo la extracción, para ello se pesan 10 g de leche cruda o de suero, y 5 g en el caso del queso fresco, y se sigue el procedimiento descrito en la sección 2.3.3.3.

Una vez completada la extracción se hace la determinación cromatográfica, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 2.3.5.3.

6.3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La media aritmética y la desviación típica fueron determinadas con el programa Microsoft Excel 2003.

6.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las Tablas 6.1., 6.2. y 6.3. muestran las concentraciones de PL, PE, PI, PC, PS y SM en mg/100 g de producto de la leche cruda, el suero y el queso fresco en las tres fabricaciones. La Tabla 6.4. muestra los valores medios y las desviaciones standard de las concentraciones citadas.

Tabla 6.1. Contenido de fosfolípidos en mg/100 g de producto en la fabricación 1.

Producto	Grasa % (m/m)	PL	PE	PI	PC	PS	SM
Leche cruda	3,70	34,4	13,5	2,7	6,2	3,1	8,9
Suero	0,05	11,7	4,5	0,6	1,4	1,4	3,8
Queso fresco	12,50	119,1	47,7	8,7	18,0	12,0	32,7

Tabla 6.2. Contenido de fosfolípidos en mg/100 g de producto en la fabricación 2.

Producto	Grasa % (m/m)	PL	PE	PI	PC	PS	SM
Leche cruda	3,81	31,6	12,1	2,0	6,2	2,6	8,7
Suero	0,03	13,2	5,3	0,7	1,8	1,2	4,2
Queso fresco	11,60	107,1	43,1	6,0	18,5	9,1	30,5

Tabla 6.3. Contenido de fosfolípidos en mg/100 g de producto en la fabricación 3.

Producto	Grasa % (m/m)	PL	PE	PI	PC	PS	SM
Leche cruda	3,83	35,6	14,5	2,5	5,7	3,4	9,4
Suero	0,02	15,6	5,8	0,8	2,6	1,3	5,2
Queso fresco	11,72	112,0	47,4	6,8	16,3	11,4	30,2

Tabla 6.4. Contenido medio de fosfolípidos en mg/100 g de producto en las tres fabricaciones.

Producto	Grasa % (m/m)	PL	PE	PI	PC	PS	SM
Leche cruda	3,78 ±0,07	33,8 ±2,0	13,4 ±1,2	2,4 ±0,4	6,0 ±0,3	3,0 ±0,4	9,0 ±0,4
Suero	0,03 ±0,02	13,5 ±1,9	5,2 ±0,6	0,7 ±0,1	1,9 ±0,6	1,3 ±0,1	4,4 ±0,7
Queso fresco	11,94± 0,49	112,7 ±6,0	46,1 ±2,5	7,1 ±1,4	17,6 ±1,1	10,8 ±1,6	31,1 ±1,4

Las Tablas 6.5., 6.6., y 6.7. muestran los contenidos relativos de fosfolípidos en los tres productos de las distintas fabricaciones y la Tabla 6.8. muestra los contenidos relativos medios.

Tabla 6.5. Contenido relativo de fosfolípidos en la fabricación 1.

Producto	PE	PI	PC	PS	SM
Leche cruda	39,42	7,71	18,07	8,87	25,93
Suero	38,60	5,44	12,19	11,71	32,05
Queso fresco	40,03	7,27	15,10	10,11	27,49

Tabla 6.6. Contenido relativo de fosfolípidos en la fabricación 2.

Producto	PE	PI	PC	PS	SM
Leche cruda	38,30	6,26	19,57	8,30	27,57
Suero	40,19	5,46	13,37	8,96	32,03
Queso fresco	40,27	5,57	17,25	8,45	28,45

Tabla 6.7. Contenido relativo de fosfolípidos en la fabricación 3.

Producto	PE	PI	PC	PS	SM
Leche cruda	40,74	7,11	15,99	9,60	26,56
Suero	36,98	4,80	16,94	8,11	33,17
Queso fresco	42,28	6,09	14,55	10,14	26,94

Tabla 6.8. Contenido relativo medio de fosfolípidos en las tres fabricaciones.

Producto	PE	PI	PC	PS	SM
Leche cruda	39,49	7,03	17,88	8,92	26,69
Suero	38,59	5,23	14,17	9,59	32,42
Queso fresco	40,86	6,31	15,63	9,57	27,63

El contenido de PL en la leche analizada en este estudio es algo mayor que el encontrado en la leche analizada en los capítulos 3 y 4 (Tablas 3.2., 3.3., 4.3. y 4.4.) y el perfil de fosfolípidos es muy similar al de la leche convencional y rica en CLA estudiadas en el capítulo 4 (Tablas 4.6. y 4.7.)

Al hacer el balance de fosfolípidos, se encuentra que la suma del contenido de fosfolípidos totales en los aproximadamente 300 kg de queso fresco producidos, junto con los aproximadamente 730 kg de suero generado es, como media, un 25,3% mayor que la cantidad de fosfolípidos que aporta la leche de partida. Ese incremento tiene su origen en el crecimiento bacteriano, con la consiguiente formación de membranas celulares, que tiene lugar en el proceso fermentativo.

El porcentaje de incremento de fosfolípidos es algo más elevado que el 21,5% de aumento que se encontró en la fermentación del QFLM. La diferencia puede atribuirse al cambio de composición del medio de crecimiento, leche en el presente capítulo frente a leche mazada en el capítulo anterior o a la utilización de un cultivo de microorganismos diferente.

El mayor incremento medio es el de SM (35,0%), seguido de PS (34,0%) y PE (27,8%), siendo mucho más bajos los de PI (8,1%) y PC (7,9%). El orden de porcentajes de incrementos es similar al que se produce en la coagulación del QFLM, si se exceptúa el mayor aumento del porcentaje de PS obtenido en el capítulo actual.

En relación con la distribución de fosfolípidos entre el queso fresco y el suero, se encuentra que, como media, el

77,4% de los PL que proceden de la leche junto con los que se forman en el proceso fermentativo quedan retenidos finalmente en el queso fresco, frente a un 22,6% que se pierden en el suero. Esto se explica porque los fosfolípidos son, mayoritariamente, constituyentes de las membranas de los glóbulos grasos y de las células bacterianas formadas en el proceso fermentativo y, tanto aquellos como estas, quedan en su mayor parte retenidos en la cuajada, cuyo contenido graso es mucho más elevado que el del suero (Tabla 6.4.). La distribución entre queso fresco y suero es muy similar para todos los fosfolípidos, variando entre un 80,7% de PI en el queso fresco frente a un 19,3% en el suero y, en el otro extremo, la SM un 74,5% en el queso fresco frente a un 25,5% en el suero. Como consecuencia, el porcentaje relativo medio de SM es mayor en el suero que en el queso fresco, el de PS es igual y los de PE, PI y PC son algo mayores en el queso fresco (Tabla 6.8.).

La concentración de PL es, por término medio, 8,3 veces más elevada en el queso fresco que en el suero. Sin embargo, como el contenido graso del suero es muy bajo, cuando la concentración de fosfolípidos se expresa en base grasa, los porcentajes se invierten, siendo la concentración media de PL en el suero 43,4 veces mayor que en el queso fresco. Este valor hay que manejarlo con precaución, puesto que el error relativo en la determinación de cantidades tan bajas de grasa en el suero es muy elevado.

Tabla 6.9. Valores recogidos en la bibliografía del contenido de fosfolípidos y su porcentaje relativo en queso fresco y suero.

Referencia	mg/100 g muestra	g/100 g grasa	%PE	%PI	%PC	%PS	%SM
Ricotta (Rombaut y col., 2007)*	278,8	2,7	53,04	5,14	18,46	6,78	16,59
Cottage (Rombaut y col., 2007)*	55,8	1,3	37,37	10,28	23,72	10,38	18,25
Quark (Rombaut y col., 2007)*	58,1	0,9	44,26	6,17	21,09	7,73	20,74
Queso fresco (Rombaut y col., 2007)*	148,9	0,6	44,40	7,23	23,55	9,12	15,69
Quark (Rombaut y col., 2005)*	32	24,7	44,89	4,49	21,55	6,82	22,27
Queso fresco ¹ (Rombaut y col, 2006)	310	29,1	-	-	-	-	-
Suero de Mozzarella (Rombaut y col., 2007)*	19,1	6,2	45,43	5,16	21,40	10,43	17,59
Suero de Cheddar (Rombaut y col., 2007)*	17,6	5,3	45,92	4,13	21,21	10,42	18,35
Suero de Emmental (Théodet y Gandermer 1994)	22	45,2					
Suero de Emmental (Baumy y col., 1990)	14	21,8	-	-	-	-	-

¹ Elaborado a partir de leche mazada

La Tabla 6.9. muestra concentraciones, publicadas por otros autores, de fosfolípidos en Ricota, quesos frescos elaborados a partir de distintas materias primas (leche y leche mazada) y sueros de distinto origen. Para hacer un estudio comparativo, hay que valorar, además del porcentaje sobre materia total, el porcentaje en base grasa. Comparando los valores obtenidos en este estudio con los de la Tabla 6.9. y los de esta tabla entre sí, se observa que según que base de referencia se utilice para calcular las concentraciones, estas serán mayores o menores en los distintos quesos analizados.

Cuando se expresa sobre materia total, la concentración de PL en el queso fresco elaborado en este capítulo es, por término medio, la tercera parte de la concentración obtenida en el QFLM estudiado en el capítulo anterior (374,0 mg/100 g) y algo más de la tercera parte de la concentración del queso fresco analizado por Rombaut y col. (2006), 310 (mg/100 g). La diferencia radica en la materia prima utilizada para la fabricación del queso fresco, leche en este capítulo frente a leche mazada, mucho más rica en fosfolípidos, en el capítulo anterior y en el estudio de Rombaut y col (2006). Debido a la tendencia que tienen los fragmentos de la membrana de los glóbulos grasos, rica en fosfolípidos, a pasar a la fase acuosa, la relación de concentraciones se hace más grande cuando se expresan en base grasa: 0,94% en el queso estudiado en este capítulo frente al 3,6% del quark estudiado en el capítulo anterior y al 29,5% del analizado por Rombaut y col. (2006).

La concentración de PL en el suero procedente de la fabricación del queso fresco de este capítulo es más baja que

cualquiera de las recogidas en la Tabla 6.9., solo, sorprendentemente, el suero procedente de queso Emmental (Baumy y col. 1990), muy diferente al de este estudio, tiene un valor muy próximo. Sin embargo, una vez más, cuando la concentración se expresa en base grasa la relación de concentraciones se invierte y solo las concentraciones del suero de otro queso Emmental (Théodet y Gandermer, 1994) es similar a la del suero procedente del queso fresco fabricado en nuestro estudio. Este cambio en la proporción de las concentraciones se debe al bajo contenido de grasa en el suero analizado en el presente estudio (Tabla 6.4.).

El perfil de fosfolípidos para la leche cruda, suero y queso fresco es similar, sólo el suero se desvía algo, con un porcentaje en PI algo menor que la leche y el queso y un contenido relativo en SM mayor (Tabla 6.8.). En relación con los quesos recogidos en la Tabla 6.9., en general, el queso fresco estudiado en este trabajo tiene un menor porcentaje relativo medio de PE y PC, y mayor porcentaje de SM. Este comentario se puede extender a la comparación de los sueros.

Sin embargo, al comparar el queso fresco tratado en este capítulo (Tabla 6.8.) se observa un mayor porcentaje relativo medio de PE y SM y menor de PC que en el queso fresco fabricado en el capítulo 5 a partir de leche mazada (Tabla 5.12.).

6.5. BIBLIOGRAFÍA

Battistotti B., Bottazzi V., Piccinardi A., Volpato G. (1985). Quesos del Mundo. Ediciones Elfos. Barcelona.

Baomy, J.J., Gestin, L., Fauquant, J., Boyaval, E., Maubois, J.L. (1990). Technologies de purification des phospholipides du lactosérum. *Process*. 1047:29-33.

BOE (2006). Real Decreto 1113/2006, por el que se aprueban las normas de calidad para quesos y quesos fundidos.

Deleuze, P. (2006). Legislación Alimentaria. Código alimentario español y disposiciones complementarias. Ediciones Tecnos. Madrid.

FIL- IDF (2000). International Standard 141C. Whole milk. Determination of milkfat, protein and lactose content. Guidance on the operation of mid-infrared instruments. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

FIL- IDF (2008). International Standard 222. Cheese. Determination of fat content. Van Gulik method. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (2015). <http://www.magrama.gob.es/gl/prensa/noticias/los-esp%C3%B1oles-consumen-una-media-de-822-kilos-de-queso-por-persona-y-a%C3%B1o-/tcm10-330094-16>.

Rombaut, R., Dewettinck, K., Camp, J.V. (2007). Phospho- and sphingolipid content of selected dairy products as determined by HPLC coupled to an evaporative light scattering detector (HPLC-ELSD). *Journal of Food Composition and Analysis*. 20:308-312.

Rombaut, R., Van Camp, J., Dewettinck, K. (2005). Analysis of phospho- and sphingolipids in dairy products by a new HPLC method. *Journal of Dairy Science*. 88:482-488.

Rombaut, R., Van Camp, J., Dewettinck, K. (2006). Phospho- and sphingolipid distribution during processing of milk, butter and whey. *International Journal of Food Science and Technology*. 41: 435-443.

Teubner O., Müller M., Müller W., Zacherl R. (2007). *Enciclopedia Practica de cocina: Quesos*. Editorial Everest. León.

Theodet, C., Gandermer, G. (1994). Fate of lipids during whey defatting process. *Lait*. 74:281-295.







7. CONCLUSIONES



Método analítico

1. El método de determinación de fosfolípidos por extracción seguida de determinación cromatográfica por HPLC con columna de sílice y detección por ELSD, permite la identificación y cuantificación de los cinco principales fosfolípidos presentes en la leche: PE, PI, PC, PS y SM.

2. La mejor calibración se alcanza cuando se utiliza un modelo exponencial. La repetibilidad, precisión intermedia, límite de detección, límite de cuantificación y exactitud son aceptables.

3. El ácido fórmico añadido al buffer de amoniaco hace que su pH sea ácido y que la vida útil de la columna aumente, aspecto relevante por su elevado coste.

Fosfolípidos en la leche convencional, ecológica y rica en CLA

4. El contenido de fosfolípidos en los distintos tipos de leche: ecológica, rica en ácido linoleico conjugado y convencional está muy por encima de la media de los valores encontrados en la bibliografía.

5. El sistema de producción ecológico (más extensivo, con modificación de la alimentación y mayor ejercicio físico de los animales) conduce a una grasa de la leche significativamente ($p < 0,05$) más rica en todos los fosfolípidos estudiados.

6. La modificación de la alimentación, con objeto de obtener una leche rica en ácido linoleico conjugado, con menor proporción de harina de maíz, mayor proporción de ácidos grasos insaturados y sales de ácidos grasos insaturados e

inclusión de semilla de lino en la dieta, conduce a una grasa de la leche significativamente ($p < 0,05$) más rica en PI, PS y PC que la de la leche convencional y con tendencia ($p < 0,10$) a mayor contenido en PE y fosfolípidos totales.

7. La proporción relativa de los distintos fosfolípidos es muy similar en la leche de producción ecológica, rica en ácido linoleico conjugado y convencional, correspondiendo los valores más elevados a la PE y los más bajos al PI.

Evolución de los fosfolípidos en la elaboración de queso fresco por UF a partir de leche mazada y en la fabricación tradicional de queso fresco a partir de leche

8. El contenido medio de fosfolípidos en la leche mazada es aproximadamente cinco veces mayor que en la leche cuando las concentraciones se expresan sobre la totalidad del producto. Sin embargo si se expresan en porcentaje de materia grasa, la relación entre las concentraciones es mucho mayor (26-29). La leche mazada contiene una menor cantidad relativa de SM que la leche.

9. A pesar de que los fosfolípidos de la leche mazada y de la cuajada no atraviesan las membranas de UF, se producen pérdidas importantes en los procesos de UF.

10. También se producen pérdidas de fosfolípidos durante la homogeneización y pasteurización de la leche mazada concentrada, aunque menores que las que se producen en la UF.

11. Durante el proceso fermentativo que tiene lugar en la elaboración de queso fresco tanto a partir de leche mazada por

UF, como a partir de leche por el procedimiento tradicional, aumenta el contenido de fosfolípidos, principalmente de SM y PE, como consecuencia del aumento del número de bacterias y la consiguiente formación de membranas celulares.

12. El perfil medio de fosfolípidos varía poco a lo largo de todas las etapas de elaboración del queso fresco, tanto por el método tradicional, como por UF a partir de leche mazada.

13. En el proceso de coagulación de la leche por el procedimiento tradicional la mayor parte de los fosfolípidos quedan retenidos en la cuajada.

14. La concentración de fosfolípidos en el queso fresco elaborado a partir de leche por el procedimiento tradicional es muy inferior a la del queso fresco elaborado a partir de leche mazada, tanto cuando se expresa sobre materia total como cuando se expresa en base grasa.

15. Es muy importante tener en cuenta el contenido graso cuando se quiere comparar la concentración de fosfolípidos entre distintos productos, como queso fresco y suero o entre un mismo producto, queso fresco o suero, de distinto origen.

